

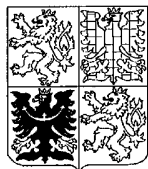
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2001 -32

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.06.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.07.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9814527**
(33) Země priority: **GB**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.06.2001**
(Věstník č. 6/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/GB99/01957**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/01417**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 47/48

(71) Přihlašovatel:
CYCLACEL LIMITED, London, GB;

(72) Původce:
Fischer Peter Martin, Arbroath, GB;
Wang Shudong, Tealing, GB;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Podávací systém

(57) Anotace:

Podávací systém, tvořený účinnou látkou, vázanou na nosič, přičemž nosič je tvořen homeoboxem peptidu nebo jeho fragmentem nebo derivátem a účinnou látkou je terapeuticky účinná nepeptidová a neoligonukleotidová účinná látka. Účinná látka je na nosič vázána přímo nebo může být vázána přes linker. Mimo to může podávací systém obsahovat ještě látku pro zacílení systému.

CZ 2001 - 32 A3

Podávací systém

Oblast techniky

Vynález se týká nového podávacího systému účinných látek do cílových buněk. Systémem je možno zajistit zlepšení distribuce, metabolismu a vylučování účinných látek. Systém je účinný jak v neporušeném, tak v disociovaném stavu.

Dosavadní stav techniky

Farmaceutický průmysl se řadu let zabývá účinným podáváním látek s léčebným účinkem tak, aby byly dopraveny na místo účinku a jejich účinek byl co nejvyšší. Některé obtíže spočívají v krátkém biologickém poločasu, s nímž se uvedené látky vylučují z těla, v nevýhodném uložení cílové tkáně nebo některých nevýhodných vlastnostech samotné účinné látky, jako je nedostatečná rozpustnost, hydrofobnost a podobně. Z toho důvodu byly vyvíjeny snahy dosáhnout v tomto směru zlepšení, účinné látky byly například chráněny před vlivem prostředí na cestě k místu působení, čímž vznikly například tablety s enterosolventním povlakem, farmaceutické lékové formy s řízeným uvolněním účinné látky a podobně.

Při vývoji peptidů a farmaceutických prostředků s jejich obsahem vznikl další problém vzhledem k možné degradaci těchto látek působením enzymů nejen v zažívací soustavě, nýbrž také v krevním oběhu. Příkladem, jak byly tyto problémy řešeny, může být zařazení peptidů do liposomů nebo polymerních mikrokuliček, v nichž je možno

peptidy dopravit do lymfatického systému.

Dalším problémem, zejména v případě látek, jejichž funkce se vyvíjí uvnitř buněk, je bariéra, tvořená buněčnou membránou. Může tedy být možné zvýšit poločas účinné látky tak, aby tato látka prošla organismem bez degradace, tento postup je však bez účinku v případě, že jde o látku, působící pouze uvnitř buněk a účinná látka nebude do buněk dopravena.

V EP 485578 se popisuje, že jako vektor pro transport do buněk je možno použít homeodoménu, odvozenou od *Drosophila antennapedia*, zejména helix 3 tohoto peptidu. Uvádí se, že jde o specifický řetězec 57 zbytků aminokyselin z uvedeného homeopeptidu, který je označován jako peptid pAntp. Uvádí se, že tento peptid má schopnost pronikat do fibroblastů a embryonálních buněk *in vivo*. Důraz je kladen na posledních 27 zbytků aminokyselin v sekvenci, které odpovídají helixu 3 a 4. Nepopisuje se však žádná vazba peptidu pAntp na další peptid nebo na účinnou látku jiné polohy.

V řadě následujících publikací, například Derossi D. a další, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 10444-10450, Joliot A. H. a další, 1991, *The New Biol.* 3, 1121-1134 a *PNAS*, 1991, 88, 1864-1868 a také Perez F. a další, *J. Cell. Sci.*, 1992, 102, 712-722 se popisuje, jakým způsobem je možno použít syntetický peptid s obsahem 16 zbytků aminokyselin, odvozených od třetího helixu svrchu uvedeného peptidu pro vnesení biologicky účinných produktů nebo antimediatorových oligonukleotidů do buněk. Použitá sekvence aminokyselin byla RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID No. 1), sekvence je označována také jako Penetratin^R.

Aby bylo možno zabránit enzymatickému rozštěpení tohoto peptidu, byla podle publikace Brugidou J. a další, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1995, 214(2), 685-693 připravena tak zvaná retro-inverso forma, tvořená D aminokyselinami v obráceném pořadí, přičemž dva isoleucinové zbytky v polohách 3 a 5 penetratinu byly nahrazeny valinem a na C zakončení byl přidán zbytek glycinu k usnadnění vazby na pryskyřici. Další retro-inverso forma byla připravena tak, že uvedený zbytek glycinu byl nahrazen cholesterolovou skupinou, vázanou přes sulfhydrylovou skupinu jako linker. Přidáním cholesterolové skupiny zlepšilo průnik vzhledem ke zvýšené hydrofobnosti molekuly.

Tento vývoj retro-inverso formy penetratinu dal vznik návrhu, který je uveden v mezinárodní přihlášce WO 97/12912 a uvádí peptidy o 16 zbytcích aminokyselin, které obsahují 6 až 10 hydrofobních aminokyselin, přičemž šestou aminokyselinou z kteréhokoliv konce je tryptofan. Tím jsou definovány minimální vlastnosti sekvencí, použitelných jako internalizační vektory.

Penetratin, jeho analogy a jeho retro-inverso formy jsou popisovány jako nosiče pro usnadnění buněčné internalizace konjugovaných peptidů nebo oligonukleotidů.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří podávací systém pro látky s léčebným účinkem pro usnadnění internalizace účinné látky do buněk a tím i k usnadnění léčebného účinku této látky. Systém může také zlepšit poločas účinné látky v organismu

člověka nebo jiného živočicha, zlepšit rozpustnost látek v biologických tekutinách, snížit známé toxické a jiné nežádoucí vedlejší účinky účinných látek, zlepšit požadovaný léčebný účinek a zajistit alternativní způsoby podání účinných látek při zlepšení metabolismu a snížení nebezpečí vzniku rezistence vůči těmto látkám.

Podávací systém podle vynálezu je tvořen účinnou látkou, vázanou na nosič, který je tvořen homeoboxem peptidu nebo jeho fragmentem nebo derivátem, přičemž účinnou látkou je látka nepeptidové a nenukleotidové povahy.

Vynález bude dále popsán v souvislosti s příloženými výkresy.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněna stabilizace tvorby mikrotubulu při použití systému podle vynálezu.

Na obr. 2 je znázorněno srovnání internalizace působením systému podle vynálezu ve srovnání s internalizací samotného nosiče.

Na obr. 3 je rovněž znázorněna internalizace systému podle vynálezu.

Obr. 4 znázorňuje nitrobuněčnou stabilitu podávacího systému podle vynálezu.

Vynález bude dále popsán v souvislosti s některými výhodnými provedeními.

Podle prvního provedení se systém podle vynálezu skládá z účinné látky, která je vázána na nosič. Na skupinu nosiče může být účinná látka vázána přímo nebo nepřímo. Ve výhodném provedení je vazba nepřímá přes vaznou skupinu, například sulfhydrylovou skupinu, karboxylovou skupinu nebo jakoukoliv větší skupinu, tak jak budou tyto skupiny dále popsány, taková skupina je obvykle označována jako linker.

Podle vynálezu jsou vhodnými účinnými látkami pro toto použití jakékoliv účinné látky, které nemají povahu peptidu nebo oligonukleotidu. Může tedy jít o cytotoxické látky, antineoplastické látky, antihypertenzivní látky, kardioprotektivní látky, antiarytmické látky, inhibitory ACE, protizánětlivé látky, diuretika, látky, uvolňující svalové napětí, látky pro místní umrtvení, hormony, látky, snižující hladinu cholesterolu, antikoagulační látky, antidepressivní látky, uklidňující látky, neuroleptika, analgetika včetně narkotik a látek s účinkem proti horečce, protivirové látky, antibakteriální látky, antifungální látky, bakteriostatické látky, látky s účinkem na CNS, protikřečové látky, látky s protiúzkostným účinkem, antacida, narkotika, antibiotika, látky pro ovlivnění funkce dýchacího ústrojí, antihistaminové látky, imunosupresiva, imunoaktivační látky, doplňky výživy, látky pro tlumení kašle, diagnostické látky, emetika a antiemetika.

S výhodou je použitou účinnou látkou cytotoxická nebo antineoplastická látka, zvláště pro použití k léčení zhoubných nádorů nebo jde o látku ve formě, aktivovatelné působením světla. Tyto látky zahrnují obecně sloučeniny,

ničící DNA, antimetabolity, protinádorová antibiotika, přírodní produkty a analogy těchto látek, inhibitory reduktázy dihydrofolátu, pyrimidinové analogy, purinové analogy, inhibitory kinázy, závislé na cyklinu, inhibitory syntetázy thymidylátu, interkalátory DNA, látky, štěpící DNA, inhibitory topoisomerázy, anthracykliny, látky z čeledi Vinca, mitomyciny, bleomyciny, cytotoxické nukleosidy, pteridinové látky, diyny, podofylotoxiny, látky s obsahem platiny, látky, vyvolávající diferenciaci a taxany. Zvláště vhodnými látkami z uvedených skupin jsou například methotrexat, methopterin, dichlormethotrexát, 5-fluorouracil, 6-merkaptopurin, trisubstituované puriny, jako olomoucín, roscovitin, bohemin a purvalanol, flavopiridol, staurosporin, cytosinarabinosid, melphalan, leurosin, actinomycin, daunorubicin, doxorubicin, mitomycin D, mitomycin A, carninomycin, aminopterin, tallysomylin, podofylotoxin a jeho deriváty, etoposid, cisplatina, carboplatina, vinblastin, vincristin, vindesin, paclitaxel, docetaxel, kyselina taxoterretinová, kyselina máselná, acetylspermidin, tamoxifen, irinotecan a camptothecin. S výhodou se účinná látka volí ze skupiny methotrexat, podofyllotoxin a jeho deriváty, etoposid, camptothecin, paclitaxel, doxorubicin, roscovitin a bohemin.

Nosičem v systému podle vynálezu může být jakákoliv skupina, schopná usnadnit internalizaci účinné látky do buněk. Vhodným nosičem jsou zejména homeoboxy peptidové povahy nebo jejich deriváty, například helix 3 takového homeoboxu. Peptid typu homeoboxu je s výhodou odvozen od homeoproteinu *Drosophila Antennapedia*, použít je možno také homology nebo deriváty této sekvence. S výhodou je

nosičem penetratinu nebo jeho derivát. Deriváty penetratinu, jež byly v literatuře popsány, například v EP 485578B se popisují sekvence, homologní vzhledem k pAntp. Další deriváty penetratinu, které je možno využít pro účely vynálezu, zahrnují zkrácené formy a/nebo modifikované formy penetratinu, které byly popsány v dokumentech WO 97/12912, v UK zveřejněné přihlášce 9825000.4, podané 13. listopadu 1998 a 9902522.3, podané 4. února 1999. Výhodnou zkrácenou formou penetratinu je sekvence RRMKWKK (SEQ ID No. 2). Další zkrácené formy zahrnují sekvence s obsahem až 15 zbytků aminokyselin, včetně NRRMKWKK, QNRRMKWKK a FQNRRMKWKK, výhodnými sekvencemi jsou peptidy, obsahující 7 zbytků aminokyselin ze skupiny KRMKWKK, RKMKWKK, RREKWKK, RRQKWKK, RROKWKK, RRMKQKK, RRMKWFK, RORKWKK, RRMWKKK a RRMKKWK, užity jsou standardní znaky pro aminokyseliny, zejména pro ornitin (O), kyselinu diaminomáselnou (B) a norleucin (N).

Pokud jde o penetratin nebo jeho deriváty, je další modifikací, která je v rámci vynálezu výhodná, přeměna volné karboxylové kyseliny na karboxyterminálním konci aminokyseliny na karboxamidovou skupinu. Jako příklad je možno uvést, že v případě, že nosičem je penetratin, může být karboxylová skupina koncového lysinu převedena na karboxamidovou skupinu. Taková modifikace zvýší stabilitu celé skupiny a tím i podávacího systému jako takového.

Nosič může být v opticky aktivní formě L nebo D. V případě, že není uvedeno jinak, nachází se nosič ve formě L. D-penetratin byl popsán v publikaci Brugidou J. a další, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1995, 214(2), 685-693. Nosič může být také převeden na retroformu, to znamená, že zbytky aminokyselin jsou v obráceném pořadí

vzhledem k původní sekvenci. Také tyto retroformy mohou existovat jako formy L a D. V jednom z výhodných provedení může být nosičem D-penetratin nebo D-forma zkrácené a/nebo modifikované formy penetratinu.

Účinná látka může být vázána na kterýkoliv konec nosiče. Například v případě, že nosičem je penetratin, odpovídající SEQ ID No. 1 nebo jeho derivát, může být účinná látka vázána na koncový lysin nebo arginin přímo nebo nepřímo. S výhodou je účinná látka vázána na aminoterminální zakončení nosiče.

Jak již bylo svrchu uvedeno, mohou být účinná látka a nosič vázány přímo nebo nepřímo přes linker. Přímá vazba může být jakákoliv běžná funkční vazba přes obvyklé skupiny, například hydroxyskupinu, karboxyskupinu nebo aminoskupinu. Nepřímá vazba, která je výhodnější, se uskuteční přes vaznou skupinu. Takovou skupinou může být bi- a multifunkční alkyl, aryl, aralkyl nebo peptidová skupina, alkyl, aryl nebo aralkylaldehyd, estery kyselin a jejich anhydridy, sulfhydrylové nebo karboxylové skupiny, jako deriváty kyseliny maleimidobenzoové, maleimidopropionové, sukcinimidoderiváty nebo deriváty odvozené od bromidu nebo chloridu kyseliny kyanurové, karbonyldiimidazolu, sukcinimidylesterů, halogenidů kyseliny sulfonové a podobně. Funkční skupiny, použité pro tvorbu kovalentních vazeb mezi linkerem a účinnou látkou na jedné straně a mezi linkerem a nosičem na druhé straně, mohou být aminoskupiny, hydrazinové skupiny, hydroxylové skupiny, thiolové skupiny, maleimidoskupina, karbonyl nebo karboxylová skupina a podobně, přičemž může jít o dvě nebo větší počet skupin. Linkerem může být krátká sekvence 1 až 4 zbytků aminokyselin, popřípadě

obsahující cysteinový zbytek, kterým se linker váže na nosič.

Linker s výhodou obsahuje cysteinový zbytek, který se snadno váže na nosič, takže vzniká vazba typu účinná látka-(linker-Cys)-nosič. V průběhu popisu přihlášky vynálezu se tento cysteinový zbytek považuje za součást linkeru. Úplný linker tedy může být vytvořen pouze v důsledku vazby účinné látky na nosič vzhledem k tomu, že tento cysteinový zbytek může být připraven také jako část nosiče. Ve výhodném provedení se linker volí ze skupiny (methyloamino)benzoyl-Cys, sukcinimidobenzoyl-Cys, sukcinimidopropionoyl-Cys, beta-alanyl-sukcinyl, acetyl-Cys a (4''-aminoanilin)-sukcinimidopropionoyl-Cys. V těchto výhodných provedeních je cysteinový zbytek s výhodou původně terminálním zbytkem nosiče, kdežto necysteinová složka linkeru se váže na účinnou látku před reakcí s nosičem. Úplný linker se tedy vytvoří až po reakci účinné látky a nosiče.

Stejným způsobem, jakým je do linkeru včleněn cysteinový zbytek, mohou být do linkeru zařazeny také další aminokyseliny, které stejně jako cystein vytvářejí spojení s nosičem. Je možno zařadit například 3 nebo 4 zbytky aminokyselin, přičemž jedním z těchto zbytků je opět s výhodou cysteinový zbytek. Je však možno použít jakékoliv zbytky aminokyselin, s výhodou jde o cystein, beta-alanin a glycin. Zařazení těchto zbytků je zvláště výhodné v případě, že nosič je zkrácenou formou penetratinu, například RRMKWKK.

Při použití může podávací systém disociovat na základě chemického nebo enzymatického štěpení mezi

účinnou látkou a nosičem. Tam, kde linker obsahuje zbytky aminokyselin, může ke štěpení docházet přímo v linkeru.

Podle vynálezu je každá molekula nosiče vázána na alespoň jednu molekulu účinné látky. Podle dalšího provedení je nosič připraven tak, aby byla usnadněna vazba na více než jednu skupinu, odvozenou od účinné látky, přičemž tyto skupiny mohou být stejné nebo odlišné. Nosič může například obsahovat složky, které samy o sobě mohou usnadnit vazbu více než jedné účinné látky, může například jít o deriváty přírodních aminokyselin nebo o vícevazné syntetické aminokyseliny, nebo může být nosič specificky upraven například při použití sítě rozvětvených lysinových zbytků, které mohou být s nosičem spojeny jako spojovací skupina, přičemž každý lysinový zbytek může být vázána na účinnou látku. Tímto způsobem může jediná molekula nosiče nést až 32 skupin účinné látky, s výhodou 2 až 10 skupiny a zvláště 4 až 5 těchto skupin. Podle dalšího provedení může být každá skupina účinné látky přímo nebo nepřímo vázána na nosič stejným nebo odlišným linkerem. V případě vazby většího počtu typů účinných látek je možno upravovat poměry a dávky jednotlivých účinných látek a tak usnadnit podávání specifické kombinace látek.

Výhodnými příklady tohoto provedení, při němž je nosičem penetratin, se sítí lysinových zbytků, spojenou s alespoň jedním koncem a usnadňující vazbu až 32 skupin účinné látky nebo při němž je nosičem penetratin nebo jeho derivát, například zkrácený derivát, odpovídající SEQ ID No. 2 mohou být jako linkery sukcinimidopropionylové skupiny, přičemž účinnou látkou může být podofylotoxin na obou koncích nosiče nebo epipodofyllotoxin s

camptothecinem nebo paclitaxelem.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu je nodičem penetratin nebo jeho derivát, který je nepřímo vázán na účinnou látku ze skupiny doxorubicin, methotrexát, podofyllotoxin a jeho deriváty, etoposid, camptothecin, paclitaxel, doxorubicin, roscovitin a bohemín.

Podle dalšího provedení vynálezu může systém dále obsahovat skupinu pro zacílení systému. Tato skupina přivádí systém ke specifickému typu buněk, v nichž je funkce účinné složky nejvýhodnější. Tato skupina tedy ovlivní přirozenou distribuci účinných látek směrem k určitému typu buněk. Tato skupina pro zacílení systému může být vázána na účinnou látku, s výhodou je však vázána na nosič.

Vhodnými skupinami tohoto typu jsou například peptidové sekvence, které byly popsány v publikacích E. Ruoslahti a další, US 5622699, Pasqualini, R. Ruoslahti, E. Nature (London), 1996, 380, 364-366, Ruoslahti, E. Ann. Rev. Cell. Dev. Biol., 1996, 12, 697-715 a Arap W., Pasqualini, R., Ruoslahti, E. Science 1998, 279, 377-380. V těchto publikacích jsou popsány určité peptidy, které mohou přivádět systém k určitému typu buněk. Po přívodu k příslušným buňkám pak dojde k usnadnění internalizace účinné látky působením nosiče.

Popsané systémy jsou nové chemické látky, jejich specifické složení je uvedeno v následující tabulce.

#	Učinná látka	Linker	Nosič
	(methotrexát) ₄	((methylamino)benzoyl-EGBA) ₄	(L) ₃ BARQIKIWFQNRMKWKK-OH
	doxorubicin	sukcinimidobenzoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	doxorubicin	sukcinimidobenzoyl-C	(D-K)(D-K)(D-W)(D-K)(D-M)(D-R)(D-R)(D-N)(D-Q)(D-F)(D-W)(D-I)(D-K)(D-I)(D-Q)(D-R-NH ₂)
	paclitaxel	2'-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
N-term C-term	paclitaxel carboxyfluorescein	2'-sukcinimidopropionoyl-GCG βA	RQIKIWFQNRMKWKK
	paclitaxel	2'-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-NH ₂
	paclitaxel	2'-sukcinimidopropionoyl-CβA	RRMKWKK-NH ₂
	paclitaxel	7-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
N-term C-term	podofyllotoxin biotinamidocaproyl	4-sukcinimidopropionoyl-GCG βA	RQIKIWFQNRMKWKK
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-NH ₂
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	(D-R)(D-Q)(D-I)(D-K)(D-I)(D-W)(D-F)(D-Q)(D-N)(D-R)(D-R)(D-M)(D-K)(D-W)(D-K)(D-K-NH ₂)
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-CβA	RRMKWKK-NH ₂
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-CβA	(D-R)(D-R)(D-M)(D-K)(D-W)(D-K)(D-K-NH ₂)
	epipodofyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	epipodofyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-NH ₂
	epipodofyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-CβA	RRMKWKK-NH ₂
	4'-demethyl epipodofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	etoposid (G2, G3 a 4')	sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	roscovotin	sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	bohemin	βA-sukcinyl-βA	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	bohemin	sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	podofyllotoxin	4-acetyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-OH
	podofyllotoxin	4-acetyl-CβA	RRMKWKK-NH ₂
	4'-demethyl epipodofyllotoxin	4-acetyl-CβA	RRMKWKK-NH ₂
	4'-demethyl epipodofyllotoxin	4-acetyl-C	RQIKIWFQNRMKWKK-NH ₂

	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-GCBA	RRMKWKK-NH ₂
	camptothecin	10-O-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-NH ₂
C-term	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	RRMKWKK
N-term	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	
N-term	epipodofyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-C	RRMKWKK
C-term	camptothecin	10-O-sukcinimidopropionoyl-C	
N-term	epipodofyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-C	RRMKWKK
C-term	paclitaxel	2'-(sukcinimido)propionoyl-C	
	4'-methoxy-epipodofyllotoxin	4-(4"-aminoanilino)sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-NH ₂
	4'-methoxy-epipodofyllotoxin	4-(4"-aminoanilino)sukcinimidopropionoyl-CBA	RRMKWKK-NH ₂
	4'-demethyl-epipodofyllotoxin	4-(4"-aminoanilino)sukcinimidopropionoyl-CBA	RRMKWKK-NH ₂

Léčebný účinek může být po aplikaci podávacího systému podle vynálezu vyvolán neporušeným systémem nebo jeho disociovanými složkami, které mohou zahrnovat účinnou látku jako takovou nebo vázanou na linker, část linkeru nebo linker a část nosiče. To znamená, že pod pojmem „podávací systém“ se rozumí celý systém nebo jakákoliv jeho část, která má požadovaný účinek.

Uvedené systémy je možno připravit jakýmkoliv známým postupem. Je například možno postupovat tak, že se sestaví peptid pAntp běžnou syntézou peptidu v roztoku nebo na pevné fázi, čímž se získá chráněný prekursor, v němž je reaktivní pouze koncová aminoskupina, zbavená ochranné skupiny. Tuto skupinu je pak možno přímo uvést do reakce s účinnou látkou nebo jejím vhodným reaktivním derivátem. Tuto aminoskupinu je také možno převést na odlišnou funkční skupinu, vhodnou pro reakci s účinnou látkou nebo linkerem. Je například možno aminoskupinu

nechat reagovat s anhydridem kyseliny jantarové, čímž se získá karboxylová koncová skupina, vhodná pro některé typy vazeb, kdežto při vazbě cysteinového derivátu se získá thiolová skupina, schopná různých selektivních vazeb. Jakmile byla získána požadovaná funkční skupina, je možno navázat účinnou látku nebo její derivát, například tvorbou amidové, esterové nebo disulfidové vazby. Je také možno navázat linker, například m-maleimidobenzoylovou skupinu, reakcí prekursoru linkeru s vhodnou funkcí s následnou tvorbou kovalentní vazby mezi linkerem a účinnou látkou. Tímto způsobem je možno připravit více vazné konstrukce, například postupným prodloužením prekursoru při použití trojvazných chemických skupin. Například prodloužení peptidového řetězce při použití $N^{\text{alfa, epsilon}}$ -Fmoc-chráněných lysinových derivátů vede ke vzniku di-, tetra- a oktavalentních konstrukcí prekursorů po 1, 2 nebo 3 vazných cyklech, spojených vždy s odstraněním ochranné skupiny.

Při použití těchto postupů může každý odborník připravit širokou škálu konjugátů účinných látek a nosičů při použití nejrůznějších linkerů. Jak bude dále uvedeno v příkladové části přihlášky, je možno volit příslušnou účinnou látku pro spojení s určitým nosičem a popřípadě linkerem, přičemž linker je možno vázat na účinnou látku nebo na nosič před vazbou těchto dvou složek.

Systemy podle vynálezu mohou být zpracovány spolu s fyziologicky přijatelným ředidlem nebo nosičem na farmaceutické prostředky pro použití u savců, zvláště v lidském nebo veterinárním lékařství. Tyto prostředky mohou být podávány například spolu s kapalným ředidlem nebo nosičem, kterým může být roztok, suspenze nebo

emulze ve vodě nebo v oleji, často jde o injekční roztok, vhodný pro parenterální podání, který musí být sterilní a prostý pyrogenních látek. Při perorálním podání se rovněž užívá kapalně ředidlo nebo nosič, obvyklejší je však pevný nosič, jako je škrob, laktóza, dextrans nebo stearan hořečnatý. Tyto pevné prostředky mohou mít formu prášku, avšak obvykle se zpracovávají na běžnější lékové formy, jako jsou tablety nebo kapsle. Je také možno využít liposomy a nanočástice.

Kromě injekčního a perorálního podání je možno účinné látky podávat také ve formě čípků nebo pesarů. Další využitelnou lékovou formou jsou látky pro podání ústní sliznicí nebo nosní sliznicí nebo celými dýchacími cestami včetně plicních sklípků. Prostředky pro místní podání zahrnují emulze, mazání, krémy, gely a spreje.

Prostředky podle vynálezu mohou být zpracovány na formy, určené pro jednotlivé podání, to znamená na prostředky, které jsou rozděleny na jednotlivé dávky nebo obsahují dílčí dávky.

Jak bude dále popsáno v příkladové části, poskytuje podávací systém podle vynálezu řadu výhod ve srovnání se známými systémy pro podávání nepeptidových a neoligonukleotidových látek. Těmito výhodami jsou vyšší účinnost ve srovnání s běžnými prostředky, zvýšený příjem do buněk, zvýšená rozpustnost ve vodě, snížení vedlejších účinků, dobrá biologická dostupnost a snížený výskyt rezistence proti účinným látkám.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k

omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Zkratky

Nomenklatura aminokyselin a peptidů odpovídá pravidlům IUPAC-IUB podle Eur. J. Biochem. 1984, 138, 9-37. Dalšími použitými zkratkami jsou: AcOH = kyselina octová, Boc = terc.tutyloxykarbonyl, Bu^t = terc.butyl, DE MALDI-TOF MS = doba desorbce v hmotové spektrometrii po extrakci matrice pomocí laseru, DIC = 1,3-diisopropylkarbodiimid, DIEA = diisopropylethylamin, DMAP = 4-dimethylaminopyridin, DMEM = modifikované Eaglovo prostředí podle Dulbecca, DMF = dimethylformamid, Et₃M = triethylamin, EtOAc = ethylacetát, Et₂O = diethylether, FCS = fetální telecí sérum, HOBT = 1-hydroxybenzotriazol, MeCN = acetonitril, MeOH = methanol, NMR = nukleární magnetická rezonance, PE = frakce petroletheru, vroucí při teplotě 40 až 60 °C, PBS = fyziologický roztok chloridu sodného s fosfátovým pufrem, Pmc = 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl, PyBOP = benzotriazol-1-yloxytrispyrrolidinufosfoniumhexafluorofosfát, RP-HPLC = vysokotlaká kapalinová chromatografie v reversní fázi, TFA = kyselina trifluoroctová, Trt = trifenylmethyl.

Obecné postupy

RP-HPLC se provádí při použití sloupců Vydac 218TP54 (4,5 x 250 mm) a 218TP1022 (22 x 250 mm) pro analytické a preparativní účely. Rychlost průtoku byla 1 ml/min pro analytické účely a 9 ml/min pro preparativní účely. Eluce při teplotě 25 °C byla prováděna při použití zvyšujícího

se gradientu MeCN ve vodě, obsahující konstantní koncentraci 0,1 % TFA, doba eluce byla 20 minut při analytických postupech nebo 40 minut při preparativních postupech. Rychlá chromatografie byla prováděna způsobem podle publikace W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, J. Org. Chem., 1978, 43, 2923-2925 při použití silikagelu Merck 60 s rozměrem částic 230 až 240 mesh. Syntéza peptidů byla prováděna na zařízení ABI 433A (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Deriváty aminokyselin byly získány od Novabiochem AG, Läufelfingen, Švýcarsko, s výjimkou Fmoc-D-Ile-OH, který byl získán od Bachem AG, Bubendorf, Švýcarsko. Byly použity standardní protokoly o syntéze ve škále 0,1 mmol nebo 0,25 mmol (programy FastMoc MonPrevPk) při použití ochranné skupiny Fmoc podle publikace G. B. Fiels, R. L. Noble, Intl. J. Peptide Protein Res., 1990, 35, 161. Peptidylové pryskyřice byly štěpeny a zbaveny ochranných skupin při použití činidla, tvořeného fenolem, vodou, thioanisolem, 1,2-ethandithiolem a TFA v poměru 0,75:0,5:0,5:0,25:10 (hmotnost/objem/objem/objem/objem) podle publikace D. S. King, C. G. Fields, G. B. Fields, Intl. J. Peptide Protein Res., 1990, 36, 255. DE MALDI-TOF MS bylo prováděno při použití spektrometru Dynamo (Thermo BioAnalysis, Hemel Hempstead, Velká Británie). Použitou matricí byla kyselina alfa-kyano-4-hydroxykořicová. Spektrometr byl kalibrován při použití příslušného množství autentického peptidu. NMR spektra byla zaznamenávána na zařízení Bruker DPX300. Paclitaxel, podophyllotoxin a 10-hydroxycamptothecin byly získány od Hande Tech Development Co. USA Int., Houston, TX, USA. 4'-demethylepipodophyllotoxin byl připraven podle publikace M. Kuhn, C. Keller-Juslén, A. von Warburg, Helv. Chim. Acta, 1969, 52, 944). Roscovitin byl

připraven podle publikace L. Havlicek, J. Hanus, J. Vesely, S. Leclerc, L. Meijer, G. Shaw, M. Strnad, J. Med. Chem. 1997, 40, 408. Bohemin, chemicky 6-(benzylamino)-2-[(3-(hydroxypropyl)amino)-9-isopropylpurin byl syntetizován obdobným způsobem. Bezvodé DMF, ClCH₂CH₂Cl a CH₂Cl₂ byly skladovány nad molekulovým sítem 4A.

Příklad 1

H-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice

Sekvence peptidu byla zahájena při použití 0,5 mmol/g Fmoc-Lys(Boc)-[(4-(hydroxymethyl)fenoxycetyl)pryskyřice], ABI 401425, bylo přidáno vždy 0,5 mmol/g následující aminokyseliny. Konečná peptidylová pryskyřice byla získána při výtěžku 100 % v množství 1,37 g. Materiál byl promyt Et₂O a sušen ve vakuu. Aby bylo možno prokázat chemickou integritu tohoto meziprojektu, byl rozštěpen malý podíl peptidylové pryskyřice a zbaven ochranných skupin, načež byl analyzován surový produkt H-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH, čistota produktu byla vyšší než 90 % při analýze pomocí RP-HPLC, chemická indentita byla prokázána pomocí DE MALDI-TOF MS a kvantitativní analýzou aminokyselin.

[H-Glu(OBu^t)-Gly-bAla]₄-Lys₂-Lys-bAla-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice

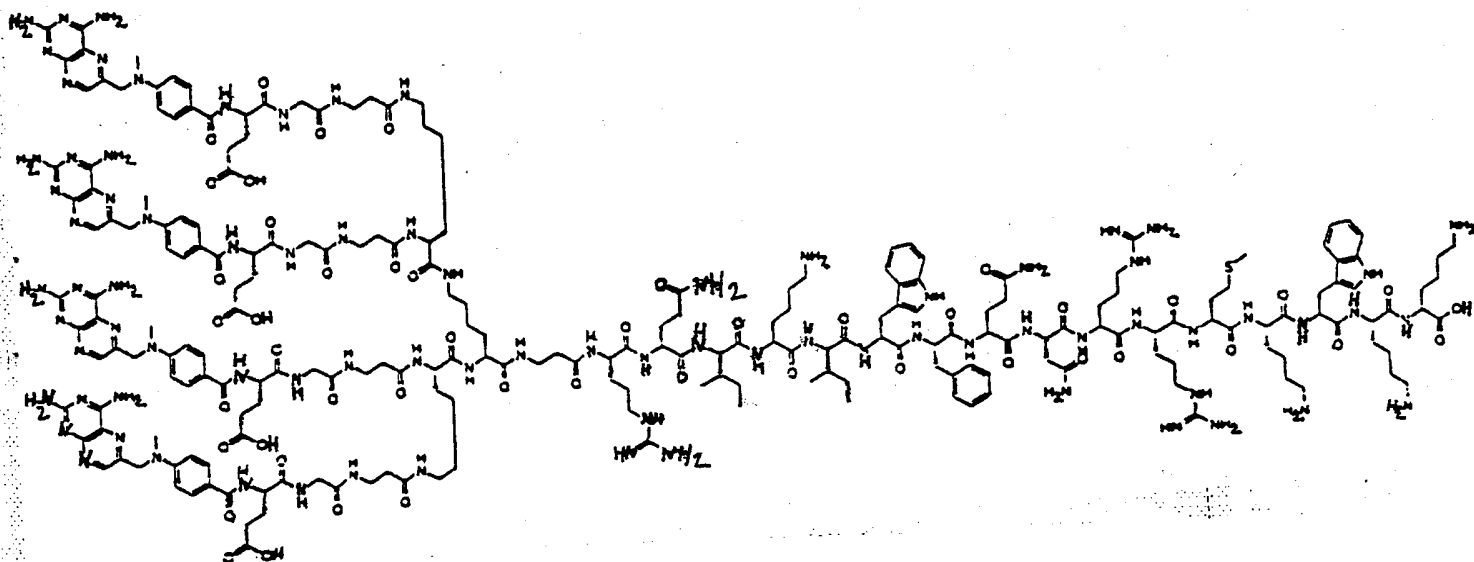
137 mg, 25 mikromol svrchu získané peptidylové pryskyřice bylo acylováno při použití 47 mg, 0,15 mmol Fmoc-betaAla-OH, 78 mg, 0,15 mmol PyBOP, 20 mg, 0,15 mmol HOBt a 39 mikrolitrů, 0,225 mmol DIEA ve 2 ml DMF v průběhu 2 hodin. Pak byla odstraněna ochranná skupina Fmoc působením 20% piperidinu v DMF po dobu 20 minut a materiál byl důkladně promyt DMF. Pak byl produkt prodloužen postupně dvojí acylací a odstraněním ochranných skupin při použití Fmoc-Lys(Fmoc)-OH v množství 0,15 mmol v prvním cyklu a 0,3 mmol ve druhém cyklu při použití obdobné vazby s následným odstraněním ochranné skupiny. Pak byl řetězec znovu prodloužen při použití 0,6 mmol Fmoc-Gly-OH a 0,6 mmol Fmoc-Glu(OBu^t)-OH opět při použití acylace s následným odstraněním ochranné skupiny Fmoc. Z výsledného produktu byla odstraněna výsledná skupina Fmoc a produkt byl důkladně promyt postupně DMF, CH₂Cl₂ a Et₂O, načež byl sušen ve vakuu. Aby bylo možno prokázat chemickou integritu tohoto meziproduktu, byl malý podíl peptidylové pryskyřice rozštěpen a postranní řetězec byl zbaven ochranných skupin, načež byl surový produkt analyzován, čímž bylo prokázáno, že jeho čistota je vyšší než 89 % při RP-HPLC, gradientu 20 až 25 % MeCN při době eluce 17,7 minut, lambda = 200 až 300 nm. Výsledným produktem je [H-Glu-Gly-betaAla]₄-Lys₂-Lys-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH, identita tohoto produktu byla prokázána pomocí DE MALDI-TPF MS: [M + H]⁺ = 3732, sumární vzorec C₁₆₅H₂₆₉N₅₃O₄₄S = 3731,30.

{[4[N-(2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)-N-methylamino]benzoyl]-Glu(OBu^t)-Gly-betaAla]₄-Lys₂-Lys-

-bAla-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-
 -Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-
 -Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice

76 mg, 25 mikromol svrchu získané peptidylové pryskyřice se nechá přes noc reagovat při teplotě místnosti se 76 mg, 0,2 mmol hemihydrochloriddihydrátu kyseliny {[4[N-(2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)-N-methylamino]benzoové a 104 mg, 0,2 mmol PyBOP, 27 mg, 0,2 mmol HOBT a 70 mikrolitrů, 0,4 mmol DIEA ve 2 ml DMF. Produkt se postupně promývá DMF, CH₂Cl₂ a Et₂O, načež se suší ve vakuu, čímž se získá 85 mg výsledné peptidylové pryskyřice jako oranžové pevné látky.

{[4[N-(2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)-N-methylamino]benzoyl]-Glu-Gly-betaAla}₄-Lys₂-Lys-bAla-
 -Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-
 -Lys-Lys-OH



Svrchu získaný produkt se rozštěpí a zbaví ochranných skupin při použití 12 ml činidla pro odštěpení ochranných skupin, reakční doba je 1,5 hodin. Zbytek pryskyřice se odfiltruje a na sintru se promyje malými podíly čisté TFA. Filtrát se spojí s promývací kapalinou, přidá se 100 ml Et₂O a směs se zchladí. Vysrážený produkt se oddělí odstředěním a etherový supernatant se slije. Produkt se ještě 3krát promyje Et₂O podobným způsobem. Výsledný surový produkt se suší ve vakuu, čímž se získá 61 mg oranžového prášku. Tento materiál se znovu rozpustí ve 4 ml 0,1% vodného roztoku TFA a pak se roztok zfiltruje. Výsledný roztok se ve dvou oddělených podílech nanese na preparativní sloupec RP-HPLC při použití gradientu 17,5 až 27,5 % MeCN. Frakce s obsahem výsledné látky se oddělí, sledují analytickou RP-HPLC a příslušné frakce se spojí. Po odstředění ve vakuu se tímto způsobem získá 13,5 mg výsledné látky. Identita byla potvrzena pomocí analytické RP-HPLC při eluci 17,8 minut při gradientu 17,5 až 27,5 % MeCN, čistota produktu byla vyšší než 99 %, lambda = 200 až 300 nm. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 4962 sumární vzorec C₂₂₅H₃₂₁N₈₁O₄₈S = 4960,54.

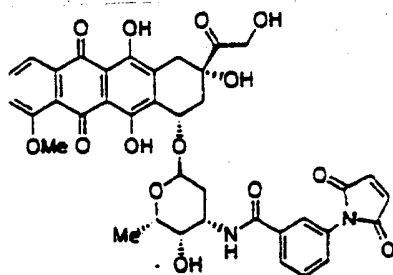
Příklad 2

H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-
Lys-Trp-Lys-Lys-OH

411 mg, 75 mikromol H-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-
-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-
-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice
podle příkladu 1 se acyluje při použití 264 mg, 0,45 mmol
Fmoc-Cys(Trt)-OH, 234 mg, 0,45 mmol PyBOP, 61 mg, 0,45

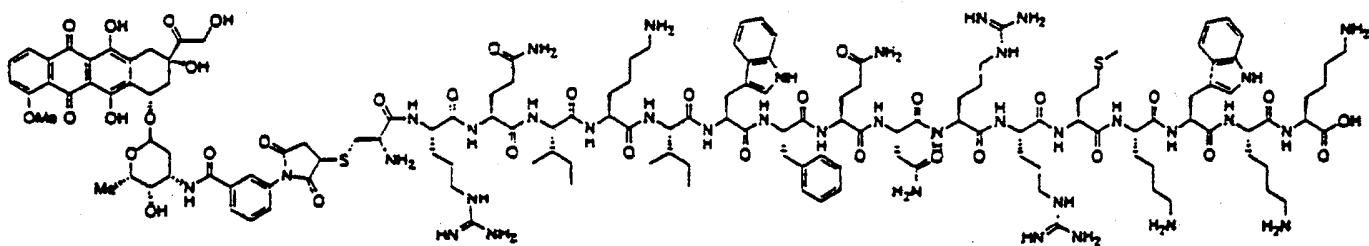
mmol HOBt a 0,12 ml, 0,675 mmol DIEA ve 3 ml DMF v průběhu 3 hodin. Výsledná peptidylová pryskyřice se promyje 3krát 25 ml DMF vždy 5 minut a pak se v průběhu 20 minut přidá 20 % piperidinu v DMF. Po filtraci reakčního činidla se takto získaný produkt H-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice se postupně promyje DMF, CH₂Cl₂ a Et₂O, načež se suší ve vakuu. Pak se produkt v průběhu 2 hodin odštěpí a zbaví ochranných skupin. Zbytek pryskyřice se odfiltruje a na sintru se promyje malým množstvím TFA. K filtrátu, spojenému s promývací kapalinou se přidá 100 ml Et₂O a směs se zchladí. Vysrážený produkt se oddělí odstředěním a heterový supernatant se slije. Produkt se ještě 3krát promyje Et₂O podobným způsobem. Získá se 238 mg surového produktu, který se suší ve vakuu. Podíl 119 mg tohoto materiálu se znovu rozpustí ve 2 ml 0,1% vodného roztoku TFA a roztok se zfiltruje. Výsledný roztok se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 17,5 až 27,5 MeCN. Příslušné frakce se oddělí a sledují se analytickou RP-HPLC, načež se příslušné frakce spojí. Po odstředění ve vakuu se získá 60,9 mg čisté výsledné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,8 minut (17,5 až 27,5 % gradient MeCN, čistota vyšší než 99 %, lambda = 214 nm), DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2351, sumární vzorec C₁₀₇H₁₇₃N₃₅O₂₁S₂ = 2349,87.

N-[3-(meleimido)benzoyl]doxorubicin



5,9 mg, 10 mikromol doxorubicinhydrochloridu se rozpustí v 1 ml vody a 0,5 ml DMF. Za míchání se přidá 0,5 ml 0,1 M vodného fosfátového pufru o pH 7,2. K výsledné suspenzi se přidá 12,9 mg, 40 mikromol N-hydroxysukcinimidesteru kyseliny 3-maleimidobenzoové po kapkách v 1 ml DMF. Červeně zbarvená reakční směs se postupně vyčeří a po přibližně 10 minutách je možno pozorovat tvorbu sraženiny. Průběh reakce se sleduje analytickou RP-HPLC, po 2 hodinách je reakce doxorubicinu úplná. Pak se směs zředí 1,5 ml vody, zchladí se na 4 °C a odstředí. Supernatant se slije. Výsledná usazenina se znovu rozpustí v 1 ml dimethylformamidu a zředí se 2 ml 0,1% vodného roztoku TFA. Tento roztok se nanese na předem naplněný sloupec v pevné fázi (500 mg LiChrolut RP-18 Merck, sloupec je předem uveden do rovnovážného stavu v MeOH s 0,1% vodným roztokem TFA). Sloupec se promývá 4 ml 0,1% vodného roztoku TFA a pak se provádí eluce směsí MeCN a vody v poměru 6:4, voda obsahuje 0,1% TFA, užijí se 2 frakce promývací kapaliny, 2krát 4 ml. První frakce obsahuje výslednou látku a přímo se použije v následujícím stupni.

N-{3-[3-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH) sukcinimido]benzoyl}doxorubicin



Svrchu získaný roztok N-[3-

(maleimido)benzoyl]doxorubicinu se zředí 1 ml DMF a přidá se 50 mikrolitrů Et_3N . Barva roztoku se změní na tmavě hnědou. Pak se přidá H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v roztoku v 1 ml DMF. Směs se míchá, v průběhu míchání se hnědá barva změní na světle červenou. Reakce se sleduje analytickou RP-HPLC. Po 1,5 hodině je reakce

3-(maleimidobenzoyl)doxorubicinu ukončena. Roztok se okyselí 0,5 ml kyseliny octové, zředí se 3 ml vody a nanese se na předem naplněný extrakční sloupec v pevné fázi, užije se 500 mg prostředku LiChrolut RP-18 (Merck). Sloupec se promyje 6 ml 0,1% vodného roztoku TFA a pak se vymývá 6 ml směsí MeCN a vody s obsahem 0,1% TFA v poměru 6:4. Eluát se suší odstředěním ve vakuu. Zbytek se znovu rozpustí ve 2 ml 0,1% vodného roztoku TFA, zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 20 až 40 % MeCN. Frakce s obsahem výsledné látky se oddělí, analyzují se analytickou RP-HPLC a podle potřeby spojí. Materiál se znovu odstředí ve vakuu, čímž se získá 1,2 mg čisté výsledné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 15,6$ a 15,8 minut (částečně oddělené thioetherové diastereomery), gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %, $\lambda = 200$ až 300 nm, DE MALDI-TOF MS:

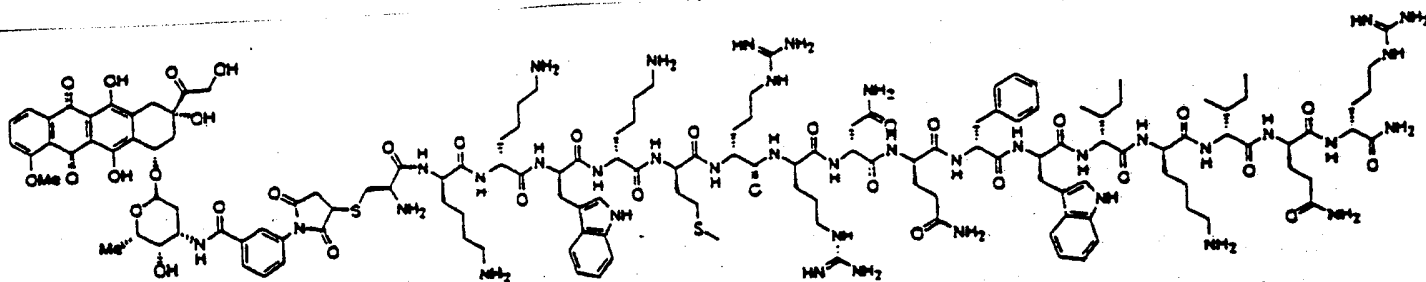
$[M + H]^+ = 3094$, $[M + 2H]^{2+} = 1548$, sumární vzorec
 $\text{C}_{145}\text{H}_{207}\text{N}_{37}\text{O}_{35}\text{S}_2 = 3092,56$.

Příklad 3

H-Cys-D-Lys-D-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Met-D-Arg-D-Arg-D-Asn-D-Gln-D-Phe-D-Trp-D-Ile-D-Lys-D-Ile-D-Gln-D-Arg-NH₂

Vychází se z 0,64 mmol/g pryskyřice Rink Amide AM (Novabiochem), čímž se získá H-Cys(Trt)-D-Lys(Boc)-D-Lys(Boc)-D-Trp-D-Lys(Boc)-D-Met-D-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-D-Asn(Trt)-D-Gln(Trt)-D-Phe-D-Trp-D-Ile-D-Lys(Boc)-D-Ile-D-Gln(Trt)-D-Arg(Pmc)-pryskyřice v kvantitativním výtěžku. Peptidylová pryskyřice se odštěpí a zbaví ochranných skupin při použití 10 ml činidla pro odštěpení/g v průběhu 2 hodin a získaný surový peptid se izoluje srážením z Et₂O, odstředěním se slitím supernatantu a sušením. Podíl 100 ml tohoto materiálu se znovu rozpustí ve 2 ml 0,1% vodného roztoku TFA roztok se zfiltruje. Výsledný roztok se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 17,5 až 27,5 % MeCN, čímž se po odstředění ve vakuu získá 36,4 mg čistého výsledného produktu. Analytická RP-HPLC: $t_R = 16,3$ minut (gradient 17,5 až 27,5 % MeCN, čistota vyšší než 99 %, $\lambda = 214$ nm). DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2350,1$, sumární vzorec C₁₀₇H₁₇₄N₃₆O₂₀S₂ = 2348,89.

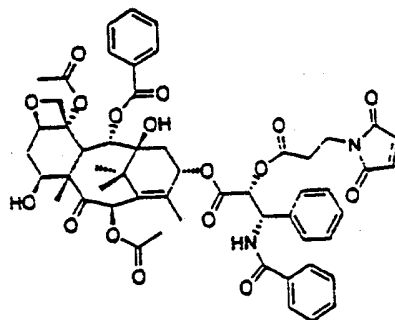
N-(3-[3-(H-Cys-D-Lys-D-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Met-D-Arg-D-Arg-D-Asn-D-Gln-D-Phe-D-Trp-D-Ile-D-Lys-D-Ile-D-Gln-D-Arg-NH₂)sukcinimido]benzoyl)doxorubicin



12,6 mg, 17 mikromol N-[3-(maleimido)benzoyl]-doxorubicinu a 20 mg, 8,5 mikromol H-Cys-D-Lys-D-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Met-D-Arg-D-Arg-D-Asn-D-Gln-D-Phe-D-Trp-D-Ile-D-Lys-D-Ile-D-Gln-D-Arg-NH₂ se rozpustí v 1 ml DMF a 100 mikrolitrech Et₃N. Směs se 2 hodiny míchá a pak se reakce zastaví přidáním směsi 0,5 ml AcOH a 0,5 ml vody a výsledná směs se zfiltruje. Filtrát se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 20 až 40 % MeCN, čímž se získá 6,3 mg produktu ve formě červené pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 16,3 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 3092,7, sumární vzorec C₁₄₅H₂₀₈N₃₈O₃₄S₂ = 3091,57.

Příklad 4

2'-(maleimidopropionoyl)paclitaxel



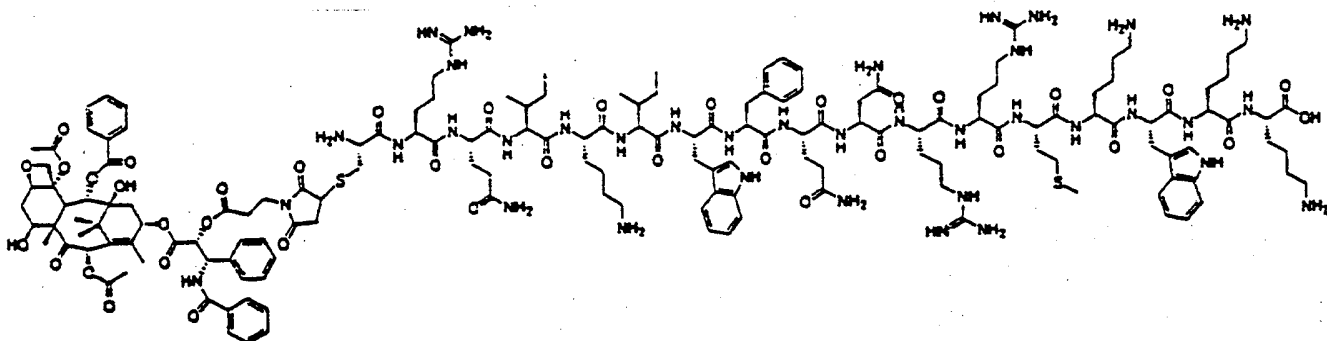
Směs 29,2 mikromol, 25 mg paclitaxelu, 0,120 mmol, 20,3 mg kyseliny 3-maleimidopropionové, 66 mikromol, 10,3 mikrolitrů DIC a 1 ml pyridinu se míchá 1 hodinu. Pak se rozopouštědlo odpaří, odparek se rozpustí ve vodě a roztok se extrahuje methylenchloridem. Organická fáze se promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného a pak

se vysuší síranem hořečnatým, rozpouštědlo se odpaří do sucha, čímž se ve výtěžku 76 % získá 22,2 mg bezbarvé pevné látky, která se nechá překrystalovat ze směsi ethylacetátu a hexanu, čímž se získá čistý produkt.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), delta: 1,13, 1,22, 1,68, 1,91 (s, každý 3H, CH_3), 2,23, 2,47 (s, každý 3H, Ac-CH_3), 2,35 (m, 2H, H_6), 2,78 (t, 4H, $J = 5,40$ Hz, CH_2), 2,84 (m, 2H, H_{14}), 3,81 (m, 2H, CH_2), 3,87 (m, 1H, H_3), 4,26 (m, 2H, H_{20}), 4,44 (dd, 1H, $J = 10,87, 4,25$ Hz, H_7), 4,98 (d, 1H, $J = 7,69$ Hz, H_5), 5,47 (d, 1H, $J = 3,45$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 5,68 (d, 1H, $J = 7,09$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 6,05 (dd, 1H, $J = 9,28, 5,86$ Hz, H_2), 6,28 (s, 1H, H_{10}), 6,18 (t, 1H, $J = 8,77$ Hz, H_{13}), 6,49 (s, 2H, CH=CH), 8,16 až 7,34 (m, 15H) Ph).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3) delta: 10,01, 15,20, 21,22, 22,54, 23,09, 27,18, 32,90, 33,71, 35,90, 43,54, 45,96, 52,86, 58,89, 72,18, 72,53, 74,86, 75,51, 76,02, 79,52, 81,42, 84,89, 126,94, 127,91, 128,74, 128,94, 129,14, 129,45, 129,59, 130,65, 132,39, 133,11, 133,85, 134,09, 134,46, 137,17, 143,25, 167,45, 168,01, 168,10, 169,77, 170,29, 171,10, 171,69, 204,24.

2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)paclitaxel



Roztok 10 mikromol, 10,05 mg
 2'-(maleimidopropionoyl)paclitaxelu a 10 mikromol,
 23,5 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-
 -Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 1 ml DMF se smísí s 1,39
 mikrolitrů, 10 mikromol Et₃N. Reakční směs se 1 hodinu
 míchá, pak se zředí 0,5 ml 0,1% vodného roztoku TFA a
 vzniklý roztok se čistí preparativní RP-HPLC při použití
 gradientu 10 až 70 % MeCN. Tímto způsobem se ve výtěžku
 62 % získá 20,5 mg produktu ve formě bezbarvé pevné
 látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 17,4 minut při použití
 gradientu 0 až 60 % MeCN, čistota produktu je vyšší než
 97 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 3355,9, sumární vzorec
 C₁₆₁H₂₂₉N₃₇O₃₈S₂ = 3354,90.

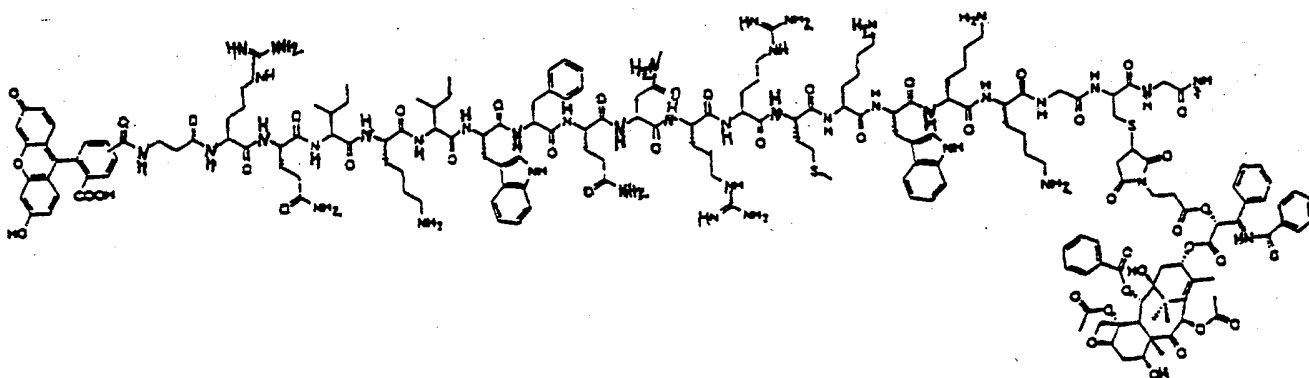
Příklad 5

4(5)-karboxyfluorescein-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-
 -Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂

Peptidová sekvence byla vytvořena při použití
 pryskyřice Rink Amide AM, bylo užito 385 mg, 0,65 mmol/g
 (Novabiochem), čímž bylo získáno v kvantitativním výtěžku
 1,50 g H-betaAla-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-
 -Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-
 -Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-Cys(Trt)-Gly-pryskyřice. Podíl
 450 mg, 75 mikromol této peptidylové pryskyřice byl
 míchán 18 hodin ve tmě s roztokem 113 mg, 0,3 mmol 4(5)-
 -karboxyfluoresceinu, 156 mg, 0,3 mmol PyBOP, 41 mg, 0,3
 mmol HOBt a 78 mikrolitrů, 0,45 mmol DIEA ve 4 ml DMF.
 Pryskyřice byla izolována pomocí sintru a postupně
 promyta DMF, CH₂Cl₂ a Et₂O. Po usušení byla pryskyřice
 zpracována po dobu 1,5 hodiny působením 5 ml činidla pro
 odštěpení za nepřístupu světla. Produkt byl izolován

vysrážením Et₂O a odstředěním bylo získáno 237 mg žlutého prášku. Podíl 100 mg tohoto prášku byl čištěn preparativní RP-HPLC při použití gradientu 22,5 až 32,5 % MeCN, čímž bylo získáno 36,9 mg čisté výsledné látky ve formě žlutého filmu po izolaci odstředěním ve vakuu. Analytická RP-HPLC: $t_R = 18,6$ a $19,2$ minut (oddělené 4- a 5-karboxyfluoresceinové geometrické isomery), gradient 22,5 až 32,5 % MeCN, čistota vyšší než 99 %, $\lambda = 214$ nm. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2892,2$, $[M + Na]^+ = 2913,7$, sumární vzorec C₁₃₅H₁₉₅N₃₉O₂₉S₂ = 2892,4.

2'-[sukcinimidopropionoyl-(4(5)-karboxyfluorescein-
-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-
-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂)]paclitaxel



K roztoku 12,3 mikromol, 12,4 mg
2'-(maleimidopropionoyl)paclitaxelu a 4,3 mikromol, 12,5
mg betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-
-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂ v 1 ml DMF se přidá
1,8 mikrolitrů Et₃N. Reakční směs se 1 hodinu míchá, pak
se zředí 0,5 ml 0,1% vodného roztoku TFA, zfiltruje a
čistí pomocí RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 %
MeCN, čímž se získá 3,2 mg čisté výsledné látky jako

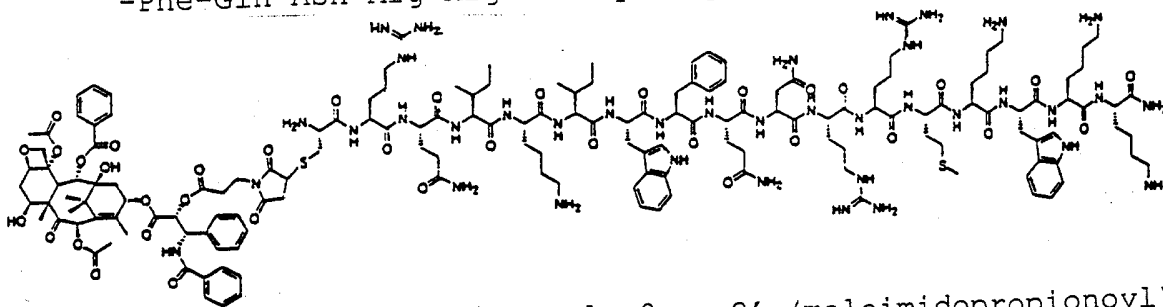
bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 21,6$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %.
 DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 3397,35$, sumární vzorec $C_{189}H_{251}N_{41}O_{46}S_2 = 3397,40$.

Příklad 6

H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-
 -Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂

Vychází se z 0,69 mmol/g pryskyřice Rink Amid AM a postupně se sestaví H-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice. Po odstranění ochranných skupin v průběhu 1,5 hodiny se surový peptid získá vysrážením z Et₂O s následným odstředěním a slitím supernatantu, pak se produkt vysuší. Podíl celkem 472 mg se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 16,5 až 26,5 % MeCN, čímž se získá 109,9 mg čistého produktu. Analytická RP-HPLC: $t_R = 16,0$ minut, gradient 17,5 až 27,5 % MeCN, čistota vyšší než 99 %, lambda = 214 nm. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2349,3$, sumární vzorec $C_{107}H_{174}N_{36}O_{20}S_2 = 2348,89$.

2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]paclitaxel



K roztoku 9 mikromol, 9 mg 2'-(maleimidopropionoyl)-paclitaxelu a 9 mikromol, 20,9 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-

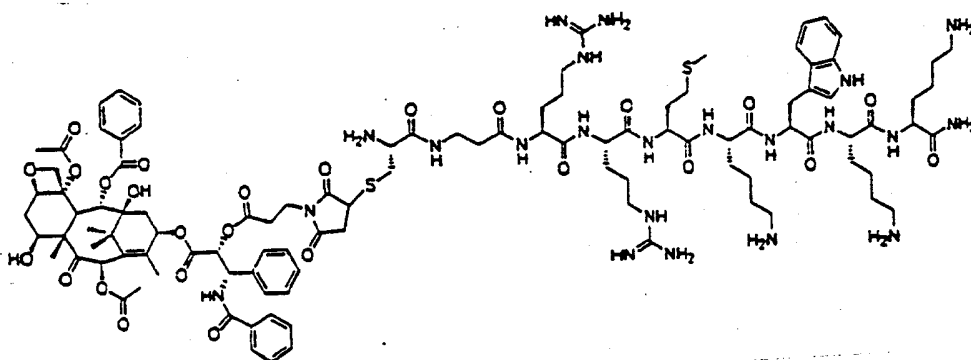
-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se přidá 1,8 mikrolitrů Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá, pak se zředí 1,5 ml 0,1% vodného roztoku TFA, roztok se zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 80 % MeCN. Tímto způsobem se ve výtěžku 53 % získá 15,9 mg čisté výsledné látky jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 18,5 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %.
 DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 3353,6, sumární vzorec C₁₆₁H₂₃₀N₃₈O₃₇S₂ = 3353,91.

Příklad 7

H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂

Vychází se z 0,69 mmol/g pryskyřice Ring Amide AM (Novabiochem) a sestaví se H-Cys(Trt)-betaAla-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice. Po odstranění ochranných skupin v průběhu 1,5 hodiny se získá vysrážením z Et₂O surový peptid po odstředění, slití supernatantu a vysušení. Podíl celkem 246 mg se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 6,5 až 16,5 % MeCN, čímž se získá 106,4 mg čistého produktu. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,8 minut, gradient 6,5 až 16,5 MeCN, čistota vyšší než 95 %, lambda = 214 nm. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 1205,4, sumární vzorec C₅₂H₉₂N₂₀O₉S₂ = 1205,55.

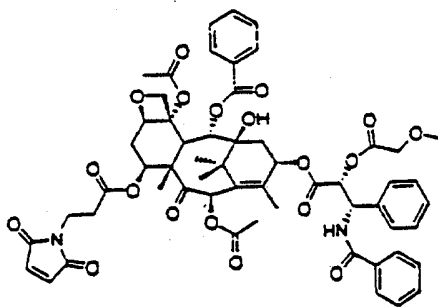
2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)paclitaxel



K roztoku 17 mikromol, 17,4 mg
 2'-(maleimidoproinoyl)paclitaxelu a 15 mikromol, 18,1 mg
 H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF
 se přidá 2,0 mikrolitru Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá, pak
 se zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití
 gradientu 10 až 70 % MeCN. Tímto způsobem se získá 9,4 mg
 produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC:
 t_R = 17,2 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší
 než 97 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2211,7, sumární
 vzorec C₁₀₆H₁₄₈N₂₂O₂₆S₂ = 2210,57.

Příklad 8

2'-methoxyacetyl-7-(maleimidopropionoyl)paclitaxel



Roztok 29 mikromol, 25 mg paclitaxelu, 0,176 mmol,
 32,8 mg N-hydroxysukcinimidylesteru kyseliny
 methoxyoctové a 0,176 mmol, 30,6 mikrolitrů DIEA v 1 ml

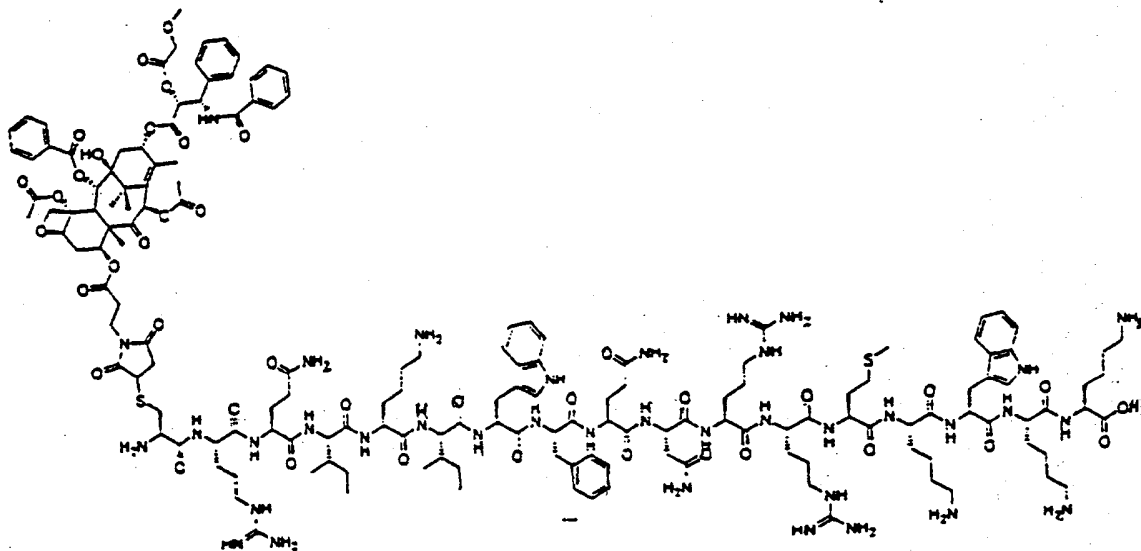
methylenchloridu se vaří 4 hodiny pod zpětným chladičem. Pak se přidá 1,6 mikrolitrů methanolu. Směs se ještě 10 minut míchá a pak se promyje 0,1 M vodným roztokem HCl, vodou, nasyceným roztokem chloridu sodného a pak se suší síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se odpaří ve vakuu, čímž se ve výtěžku 91 % získá 24,8 mg

2'-(methoxyacetyl)paclitaxelu ve formě pevné bílé látky.

30 mikromol tohoto materiálu spolu s kyselinou 3-maleimidopripionovou, 4,1 mikrolitru, 90 mmol DIC a 20 mikromol, 2,6 mg DMAP se rozpustí ve 2,5 ml methylenchloridu a směs se 40 minut míchá. Pak se směs promyje vodou vysuší se síranem hořečnatým. Pak se rozpouštědlo odpaří ve vakuu, čímž se získá světle žlutá pevná látka, která se rozpustí ve směsi DMF a methanolu, zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 20 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku 76 % získá čistý produkt jako bezbarvá pevná látka v množství 24,4 mg. Analytická RP-HPLC: $t_R = 21,8$ minut, gradient 10 až 70 % MeCN, čistota vyšší než 98 %.

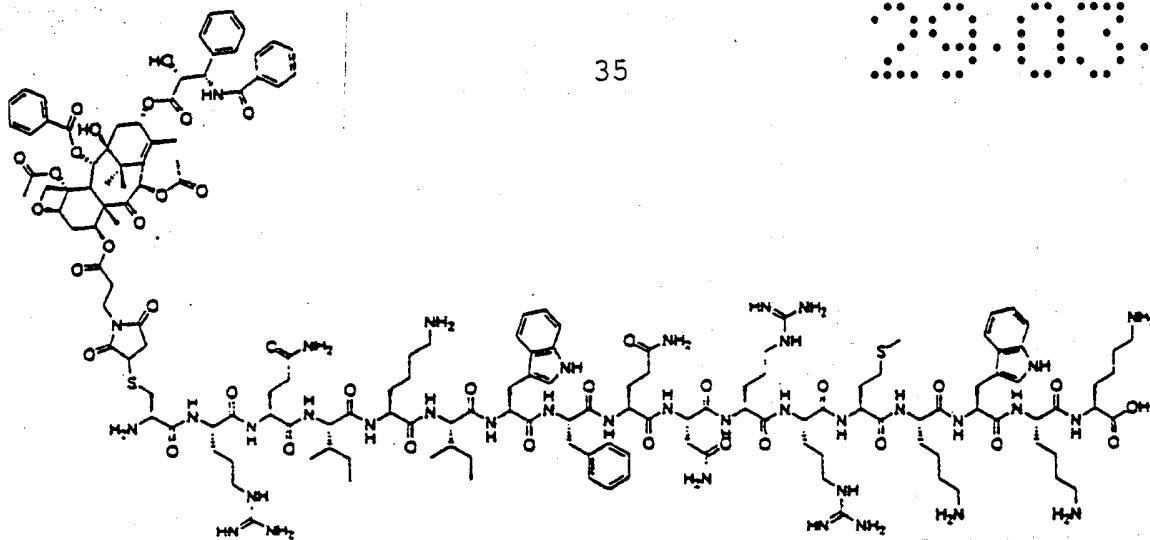
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 1,15, 1,20, 1,79, 1,96 (s, každý 3H, $\text{CH}_3 \times 4$), 2,20, 2,45 (s, každý 2H, $\text{Ac-CH}_3 \times 2$), 2,34 (m, 2H, H6), 2,63 (m, 4H, H14, CH_2), 3,40 (s, 3H, OCH_3), 3,73-3,94 (m, 3H, CH_2 , H3), 4,16-4,21 (m, 2H, H20), 4,97 (d, 1H, $J = 8,06$ Hz, H5), 5,54-5,69 (m, 3H, H7, H2, H3'), 5,98 (m, 1H, H2'), 6,22 (s, 1H, H10), 6,24 (m, 1H, H13), 6,68 (s, 2H, CH=CH), 7,12-8,13 (m, 15H, Ph).

2'-methoxyacetyl-7-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]paclitaxel



K roztoku 11 mikromol, 12,3 mg 2'-methoxyacetyl-7-(maleimidopropionoyl)paclitaxelu a 11 mikromol, 26,8 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 1 ml DMF se přidá 1,58 mikrolitrů, 11 mikromol Et₃N. Směs se 2 hodiny míchá, pak se zředí 0,5 ml 0,1% vodného roztoku TFA a čistí se preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN. Tímto způsobem se ve výtěžku 40 % získá 15,5 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,1 minut (gradient 10 až 70 % MeCN, čistota vyšší než 97 %). DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 3425,99, sumární vzorec C₁₆₄H₂₃₃N₃₇O₄₀S₂ = 3424,96.

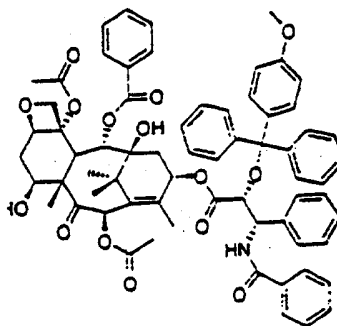
7-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]paclitaxel



K 35 mikromol, 11,9 mg 2'-methoxyacetyl-7-
 -[sukcinimidiopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-
 -Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]paclitaxelu
 v 1 ml methanolu se přidá 0,21 mikrolitrů methanolaminu.
 Směs se 1 hodinu míchá, zředí se 0,5 ml 0,1% vodného
 roztoku TFA, roztok se zfiltruje a čistí preparativní RP-
 HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN. Tímto
 způsobem se ve výtěžku 48 % získá 5,6 mg čistého produktu
 jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,3$
 minut, gradient 10 až 70 % MeCN, čistota vyšší než 97 %.
 DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 3355,7$, sumární vzorec
 $C_{161}H_{229}N_{37}O_{38}S_2 = 3354,90$.

Příklad 9

2'-(p-methoxytrityl)paclitaxel

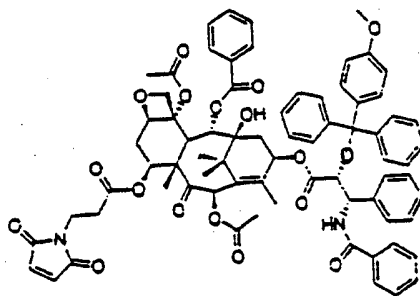


Roztok 0,632 mmol, 540 mg paclitaxelu a 10 molárních
 ekvivalentů p-methoxytritylchloridu v 10 ml
 methylenchloridu se smísí pod dusíkem s 1,3 ml pyridinu.
 Směs se 22 hodin míchá a pak se rozpouštědlo odpaří ve

vakuu. Odparek se znovu rozpustí v ethylacetátu, promyje se vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného, načež se vysuší síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se odpaří, čímž se získá světle žlutá pevná látka, která se čistí rychlou chromatografií při použití směsi EtOAc/PE v poměru 8:9, čímž se v kvantitativním výtěžku získá čistý produkt. Po překrystalování ze směsi ethylacetátu a methylenchloridu se získá světle žlutá krystalická látka.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 1,08, 1,15, 1,51, 1,65 (s, každý 3H, $\text{CH}_3 \times 4$), 1,90 (m, 1H, H6), 2,25, 2,29 (s, každý 3H, $\text{Ac-CH}_3 \times 2$), 2,55 (m, 1H, H6), 2,54 (m, 2H, H14), 3,75 (s, 3H, OCH_3), 3,66 (m, 1H, H3), 4,20 (m, 2H, H20), 4,40 (m, 1H, H7), 4,62 (m, 1H, H2'), 4,94 (d, 1H, $J = 8,06$ Hz, H5), 5,61 (m, 1H, H2), 5,70 (m, 2H, H13, H3'), 6,19 (s, 1H, H10), 6,72-8,08 (m, 29H, Ph).

2'-(p-methoxytrityl)-7-(maleimidopropionoyl)paclitaxel

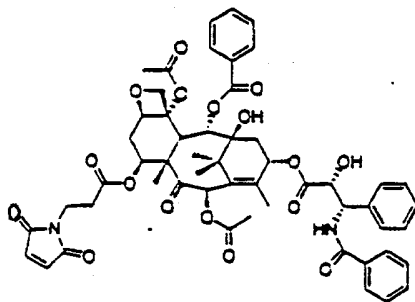


35 mikromol, 38,4 mg 2'-(p-methoxytrityl)paclitaxelu a 125 mikrolitrů pyridinu se rozpustí ve 2 ml methylenchloridu. Pak se přidá roztok 1,48 mmol, 250,5 mg kyseliny 3-maleimidopropionové, 0,80 mmol, 101,5 mg DIC a 10 mg DMAP ve 2 ml methylenchloridu a směs se 1 hodinu míchá. Rozpouštědlo se odpaří a oparek se dělí mezi vodu a methylenchlorid. Organická vrstva se promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného a vysuší se síranem

hořečnatým. Rozpouštědlo se odpaří a odparek se čistí chromatografií na tenké vrstvě za současného odstředění (Chromatrotron^R) při použití směsi EtOAc/PE 5:4. Po překrystalování ze směsi ethylacetátu a methylenchloridu se ve výtěžku 49 % získá 22 mg produktu ve formě bezbarvé pevné látky.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) delta: 1,18, 1,12, 1,76, 1,96 (s, každý 3H, CH₃x4), 2,17, 2,26 (s, každý 3H, Ac-CH₃x2), 2,10, 2,34 (m, 2H, H6), 2,62 (m, 4H, H14, CH₂-Mim), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 3,73-3,79 (m, 3H, CH₂-Mim, H3), 4,06 (m, 2H, H20), 4,61 (d, 1H, J = 3,47 Hz, H2'), 4,76 (d, 1H, J = 9,52 Hz, H5), 5,53 (m, 1H, H7), 5,60 (d, 1H, J = 6,98 Hz, H3'), 5,71 (m, 1H, H2), 6,14 (s, 1H, H10), 6,60 (m, 3H, H13, CH=CH), 6,75-7,79 (m, 29H, Ph).

7-(maleimidopropionoyl)paclitaxel

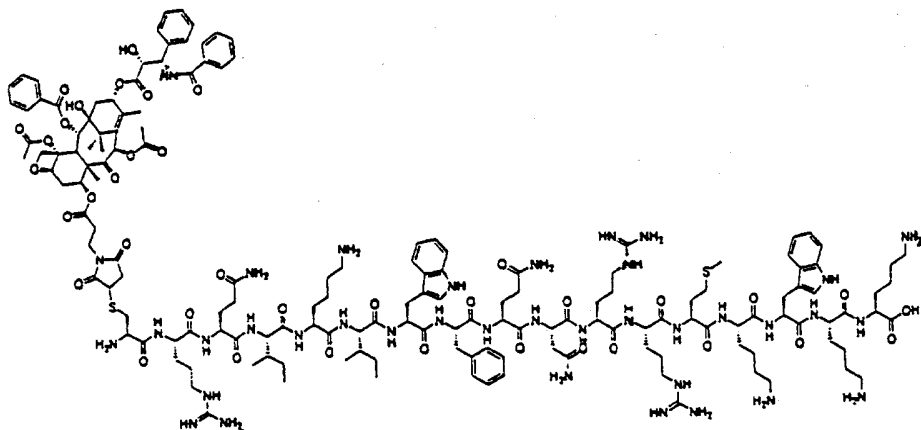


Roztok 17 mikromol, 22 mg 2'-(p-methoxytrityl)-7-(maleimidopropionoyl)paclitaxelu, 1,72 mmol, 186,4 mg anisolu a 0,172 mmol, 16,3 mg kyseliny chloroctové v 10 ml methylenchloridu se míchá 5 hodiny. Pak se reakční směs promyje 1% vodným roztokem uhličitanu sodného,

vodou, nasyceným roztokem chloridu sodného a pak se vysuší síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se odpaří do sucha a odparek se čistí chromatografií na tenké vrstvě za současného odstředění (Chromatotron^R) při použití EtOAc/PE 1:1, čímž se získá 24 mg čistého produktu jako bílá pevná látka, která se nechá překrystalovat ze směsi ethylacetátu a methylenchloridu.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) delta: 1,15, 1,18, 1,20, 1,76, 2,04 (s, každý 3H, CH₃x4), 2,18, 2,37 (s, každý 3H, Ac-CH₃x2), 2,34 (m, 2H, H6), 2,64 (m, 4H, H14, CH₂), 3,78-3,91 (m, 3H, CH₂, H3), 4,12 (m, 2H, H20), 4,71 (d, 1H, J = 3,25 Hz, H2'), 4,94 (d, 1H, J = 8,17 Hz, H5), 5,54 (dd, 1H, J = 10,46, 7,21 Hz, H7), 5,66 (d, 1H, J = 6,88 Hz, H3'), 5,80 (dd, 1H, J = 8,92, 2,42 Hz, H2), 6,15 (m, 1H, H13), 6,18 (s, 1H, H10), 6,68 (s, 2H, CH=CH), 7,10-8,12 (m, 15H, Ph).

7-[sukcinimidiopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]paclitaxel

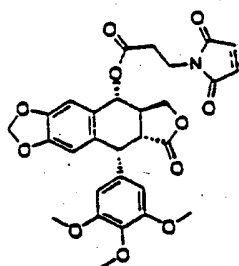


K roztoku 4,8 mikromol, 4,8 mg 7-(maleimido-propionoyl)paclitaxelu a 4,8 mikromol, 11,2 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 1 ml DMF se přidá 0,67 mikrolitrů Et₃N. Směs se míchá 30 minut, pak se zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se ve

výtěžku 54 % získá 8,6 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,3$ minut, gradient 10 až 70 % MeCN, čistota vyšší než 97 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 3355,0$, sumární vzorec $C_{161}H_{229}N_{37}O_{38}S_2 = 3354,90$.

Příklad 10

4-(maleimidopropionoyl)podofyllotoxin

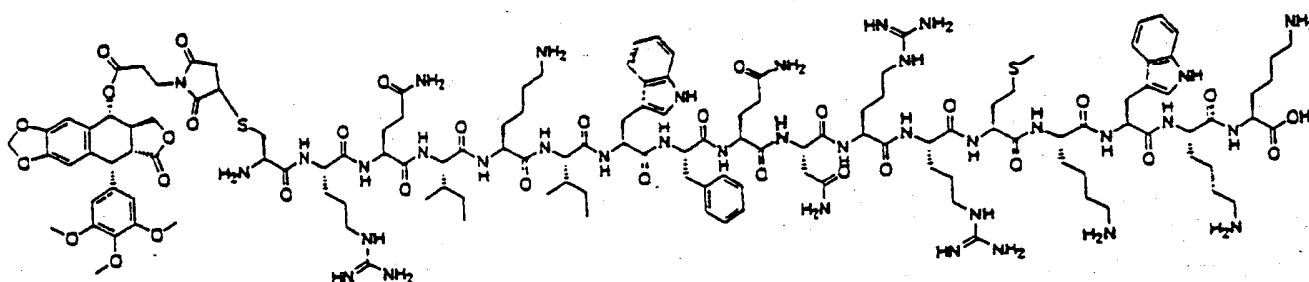


Roztok 60 mikromol, 25,6 mg podofyllotoxinu, 0,31 mmol, 52,4 mg kyseliny 3-maleimidopropionové, 0,17 mmol, 21,5 mg DIC a 80 mikromol, 10 mg DMAP ve 2 ml methylenchloridu se 1 hodinu míchá. Pak se rozpouštědlo odpaří ve vakuu a odparek se znovu rozpustí v 1 ml směsi DMF a methanolu a čistí se preparativní RP-HPLC při použití gradientu 20 až 70 % MeCN, čímž se získá 7,3 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 20,1$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) delta: 2,66-2,71 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2), 2,82-2,84 (m, 2H, H2 a H3), 3,69 (s, 6H, $OCH_3 \times 2$), 3,75 (s, 3H, OCH_3), 3,83 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2), 4,12 (t, $J = 9,92$ Hz, 1H, H11), 4,31 (m, 1H, H11),

4,53 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H, H1), 5,80 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H4), 5,92 (dd, $J = 5,49, 1,17$ Hz, 2H, OCH₂O), 6,32 (s, 2H, H2'6'), 6,47 (s, 1H, H8), 6,66 (s, 2H, CH=CH), 6,74 (s, 1H, H5).

4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]podofyllotoxin



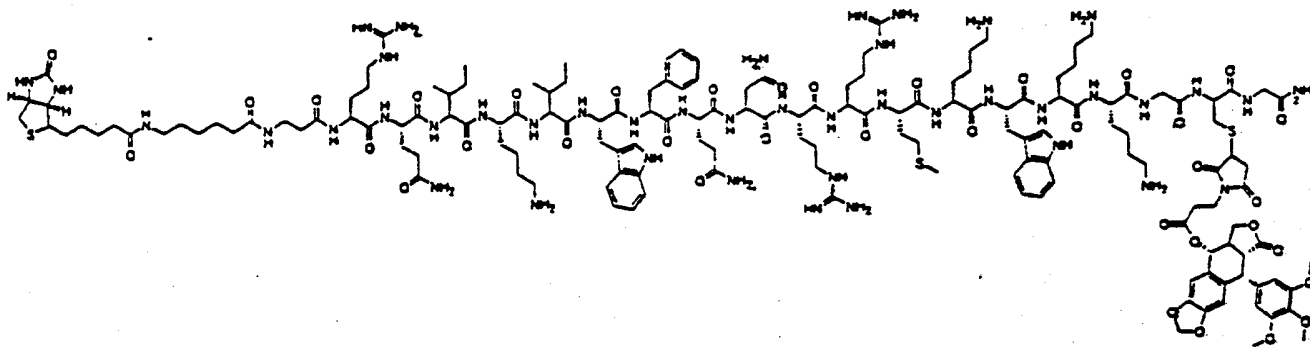
K roztoku 8 mikromol, 5 mg 4-(maleimidopropionoyl)-podofyllotoxinu a 7,7 mikromol, 18 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 1 ml DMF se přidá 1,06 mikrolitrů, 11,4 mikromol Et₃N. Směs se 30 minut míchá, pak se zředí 0,5 ml 0,1% vodného roztoku TFA, zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 35 % získá čistý produkt jako 7,8 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 12,8$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2915,34$, sumární vzorec C₁₃₆H₂₀₀N₃₆O₃₂S₂ = 2915,40.

Příklad 11

Biotinamidokaproyl-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-
-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂

450 mg, 75 mikromol H-betaAla-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-
-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-
-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-
-Cys(Trt)-Gly-pryskyřice se míchá spolu s roztokem 136
mg, 0,3 mmol N-hydroxysukcinimidylesteru kyseliny
biotinamidokapronové, 41 mg, 0,3 mmol HOBt a 105
mikrolitrů, 0,6 mmol DIEA ve 3 ml DMF celkem 18 hodin.
Peptidylová pryskyřice se oddělí pomocí sintru a postupně
se promyje DMF, CH₂Cl₂ a Et₂O. Po usušení ve vakuu se na
pryskyřici 1,5 hodiny působí 5 ml činidla pro odštěpení.
Biotinylovaný peptid se izoluje srážením Et₂O a
odstředěním, čímž se získá 244 mg produktu. Podíl 120 mg
tohoto produktu se čistí preparativní RP-HPLC při použití
gradientu 20 až 30 % MeCN, čímž se získá 63,8 mg produktu
jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 16,7
minut, gradient 20 až 30 % MeCN, čistota vyšší než 99 %,
lambda = 214 nm. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2874,3, [2M
+ H]⁺ = 5738,7, [M + 2H]²⁺ = 1437,8, sumární vzorec
C₁₃₀H₂₁₀N₄₂O₂₆S₂ = 2873,52.

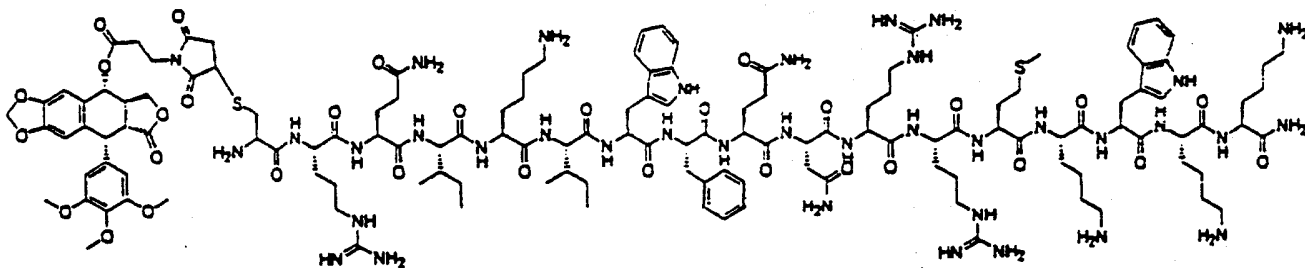
4-[sukcinimidopropionoyl-(biotinamidokaproyl-betaAla-Arg-
-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-
-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂)]podofyllotoxin



K roztoku 7 mikromol, 4 mg 4-(maleimidopropionoyl)-podofyllotoxinu a 7 mikromol, 27,7 mg biotinamidokaproyl-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂ v 0,5 ml DMF se přidá 10 mikrolitrů Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá, pak se zředí 0,5 ml 0,1% vodného roztoku TFA, roztok se zfiltruje čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN. Tímto způsobem se získá 2,2 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 17,2 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 3438,9, sumární vzorec C₁₅₉H₂₃₇N₄₃O₃₇S₂ = 3439,05.

Příklad 12

4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]podofyllotoxin



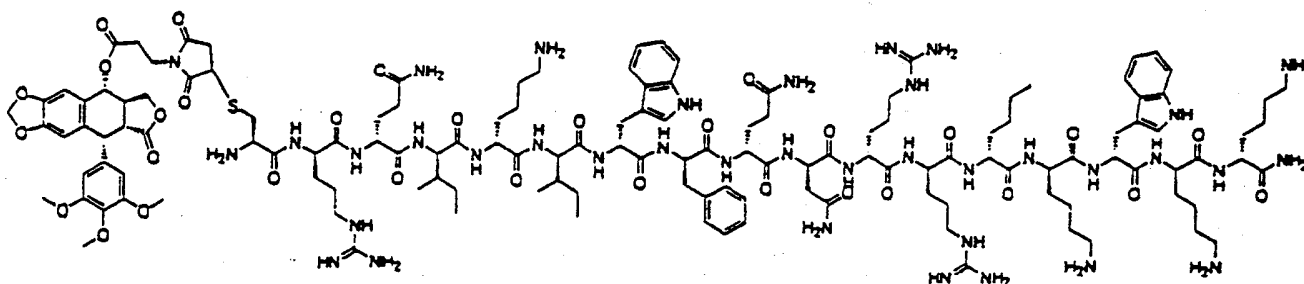
K roztoku 20 mikromol, 12,2 mg 4-(maleimido-propionoyl)podofyllotoxinu a 15 mikromol, 34,7 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1,5 ml DMF se přidá 5 mikrolitrů Et₃N. Směs se 40 minut míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 69 % získá 30,1 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,8 minut, gradient 0 až 50 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2914,4, sumární vzorec C₁₃₆H₂₀₁N₃₇O₃₁S₂ = 2914,41.

Příklad 13

H-Cys-D-Arg-D-Gln-D-Ile-D-Lys-D-Ile-D-Trp-D-Phe-D-Gln-D-Asn-D-Arg-D-Arg-D-Nle-D-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Lys-NH₂

Vychází se z 0,69 mmol/g pryskyřice Rink Amide AM (Novabiochem), čímž se sestaví H-Cys(Trt)-D-Arg(Pmc)-D-Gln(Trt)-D-Ile-D-Lys(Boc)-D-Ile-D-Trp-D-Phe-D-Gln(Trt)-D-Asn(Trt)-D-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-D-Nle-D-Lys(Boc)-D-Trp-D-Lys(Boc)-D-Lys(Boc)-pryskyřice. Po odstranění ochranných skupin v průběhu 1,5 hodiny, se získá surový peptid vysrážením z Et₂O odstředěním, slitím supernatantu a usušením. Podíly s celkovou hmotností 246 se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 17,5 až 27,5 % MeCN, čímž se získá 45,9 mg čistého produktu. Analytická RP-HPLC: t_R = 16,9 minut, gradient 17,5 až 27,5 % MeCN, čistota vyšší než 99 %, lambda = 214 nm. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2330,3, sumární vzorec C₁₀₈H₁₇₆N₃₆O₂₀S = 2330,85.

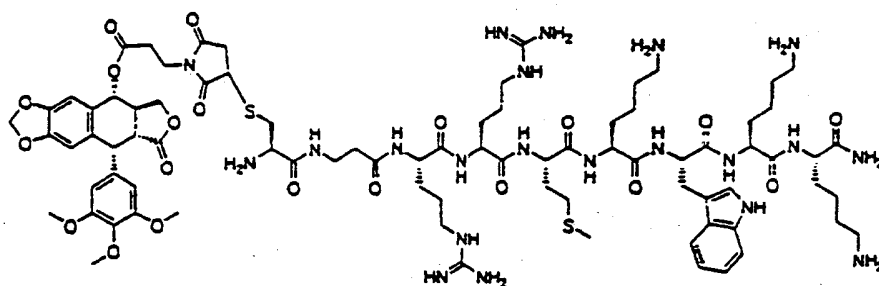
4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-D-Arg-D-Gln-D-Ile-D-Lys-D-Ile-D-Trp-D-Phe-D-Gln-D-Asn-D-Arg-D-Arg-D-Nle-D-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Lys-NH₂)]podofyllotoxin



K roztoku 11 mikromol, 6,2 mg 4-(maleimido-propionoyl)podofyllotoxinu a 7 mikromol, 17 mg H-Cys-D-Arg-D-Gln-D-Ile-D-Lys-D-Ile-D-Trp-D-Phe-D-Gln-D-Asn-D-Arg-D-Arg-D-Nle-D-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se přidá 1,4 mikrolitru Et₃N. Směs se 30 minut míchá, pak se zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 52 % získá 10,5 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,8 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2895,66, sumární vzorec C₁₃₇H₂₀₃N₃₇O₃₁S₂ = 2896,37.

Příklad 14

4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]podofyllotoxin



K roztoku 17,7 mikromol, 10 mg 4-(maleimido-propionoyl)podofyllotoxinu a 25 mikromol, 30,4 mg H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1,5 ml DMF se přidá 3,5 mikrolitru Et₃N. Směs se 40 minut míchá, pak se zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN. Tímto způsobem se ve výtěžku 57 % získá 17,8 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 14,8 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 1772,3, sumární vzorec C₈₁H₁₁₉N₂₁O₂₀S₂ = 1771,07.

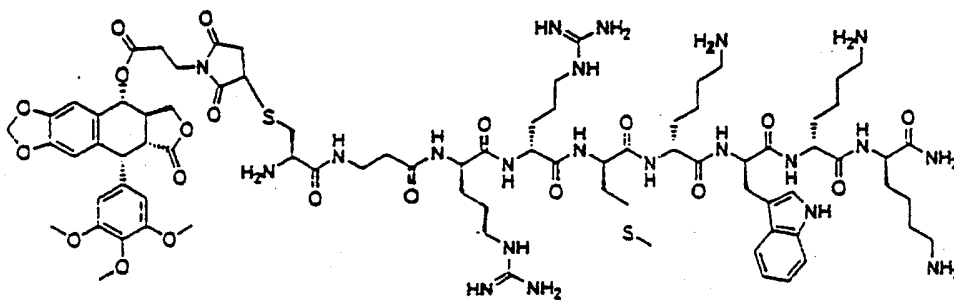
Příklad 15

H-Cys-betaAla-D-Arg-D-Arg-D-Met-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Lys-NH₂

Vychází se z 0,69 mmol/g pryskyřice Rink Amide AM (Novabiochem) a sestaví se H-Cys-(Trt)-betaAla-D-Arg(Pmc)-D-Arg(Pmc)-D-Met-D-Lys(Boc)-D-Trp-D-Lys(Boc)-D-Lys(Boc)-pryskyřice. Po odstranění ochranných skupin v průběhu 1,5 hodiny se získá surový peptid vysrážením z Et₂O, odstředěním, slitím supernatantu a vysušením. Podíly s celkovou hmotností 237 mg se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 8 až 18 % MeCN, čímž se získá 66 mg čistého produktu. Analytická RP-HPLC: t_R = 12,9 minut, gradient 9 až 19 % MeCN, čistota vyšší než

99 %, lambda = 214 nm. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 1207,2$, sumární vzorec $C_{52}H_{92}N_{20}O_9S_2 = 1205,55$.

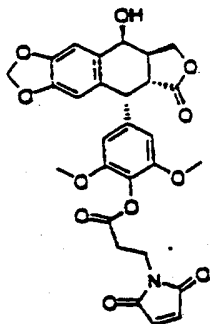
4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-betaAla-D-Arg-D-Arg-D-Met-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Lys-NH₂)]podofyllotoxin



K roztoku 18,9 mikromol, 10,7 mg 4-(maleimido-propionoyl)podofyllotoxinu a 28 mikromol, 33,8 mg H-Cys-betaAla-D-Arg-D-Arg-D-Met-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Lys-NH₂ v 1,5 ml DMF se přidá 1,5 mikrolitrů Et₃N. Směs se 40 minut míchá, pak se zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN. Tímto způsobem se ve výtěžku 21 % získá 6,9 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,8$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 1771,5$, sumární vzorec $C_{81}H_{119}N_{21}O_{20}S_2 = 1771,07$.

Příklad 16

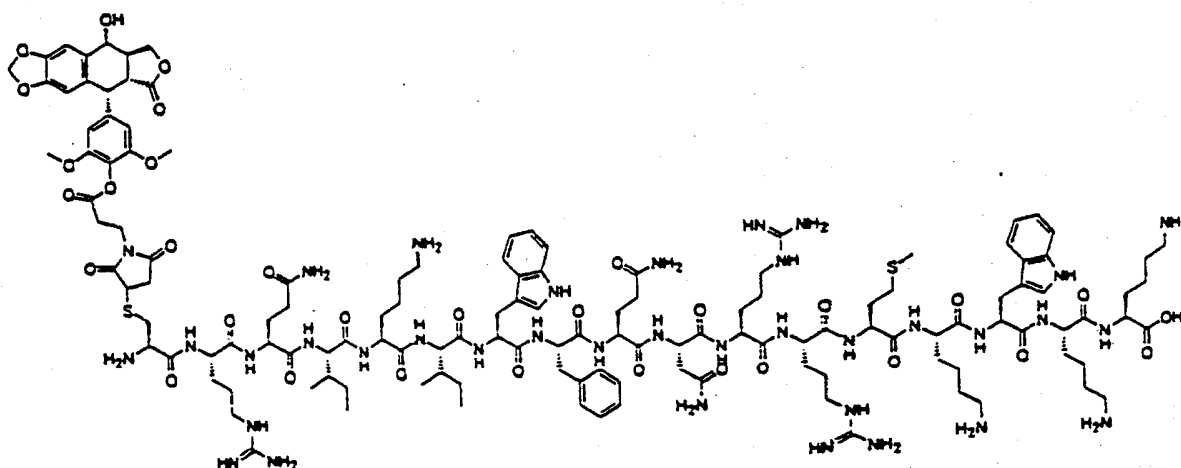
4'-(maleimidopropionoyl)epipodofyllotoxin



Roztok 12 mmol, 5 mg 4'-demethylepipodofyllotoxinu, 50 mikromol, 12,2 mg kyseliny 3-maleimidopropionové a 28 mikromol, 3,47 mg DIC v 1 ml pyridinu se 30 minut míchá. Pak se přidá 0,5 ml methanolu a směs se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 62 % získá 4,2 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 17,6$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), delta: 2,84 (m, 1H, H2), 2,99 (t, $J = 7,44$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Mim}$), 3,32 (dd, $J = 14,04, 5,07$ Hz, 1H, H2), 3,69 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3,95 (t, $J = 7,44$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Mim}$), 4,39 (dd, $J = 8,13, 4,28$ Hz, 2H, H11), 4,66 (d, $J = 5,00$ Hz), 1H H1), 4,89 (d, $J = 3,32$ Hz, 1H, H4), 6,01 (d, $J = 6,42$ Hz, 2H, OCH_2O), 6,32 (s, 2H, H2'6'), 6,57 (s, 1H, H8), 6,74, (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,90 (s, 1H, H5).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) delta: 28,64, 31,02, 32,55, 37,33, 39,53, 42,99, 55,15, 65,78, 66,56, 100,65, 106,54, 107,97, 109,65, 130,68, 130,92, 133,21, 136,96, 146,62, 147,61, 150,39, 167,36, 169,30, 173,89.

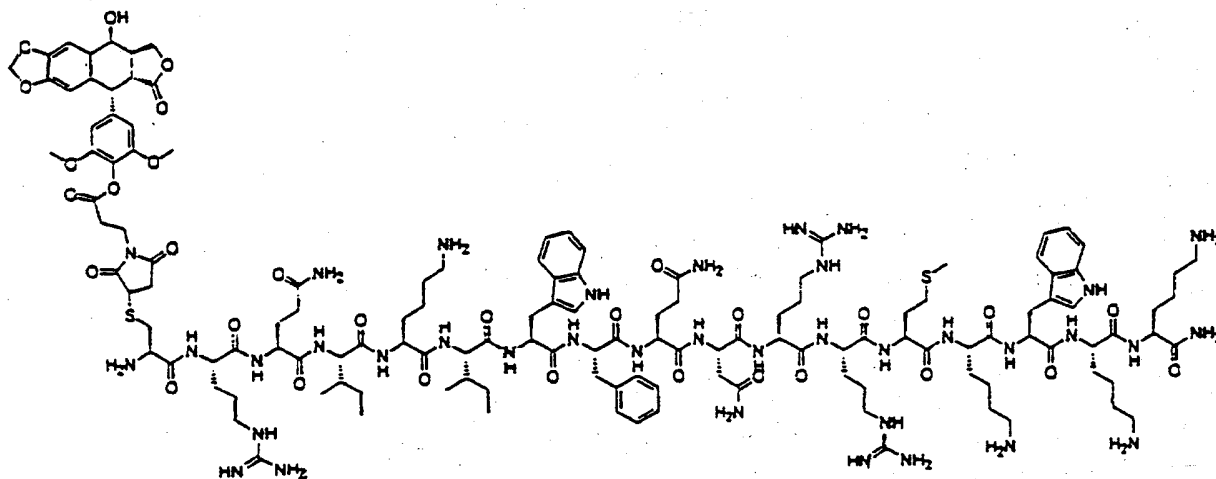
4'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]epipodofyllotoxin



K roztoku 2,3 mikromol, 1,3 mg 4'-(maleimidopropionoyl)epipodofyllotoxinu a 2,3 mikromol, 5,4 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 0,5 ml DMF se přidá 0,21 mikrolitrů, 2,3 mikromol Et₃N. Směs se míchá 40 minut a pak se zředí 1 ml 0,1% vodného roztoku TFA, roztok se zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 48 % získá čistý produkt jako 3,2 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 14,6 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2902,2, sumární vzorec C₁₃₅H₁₉₈N₃₆O₃₂S₂ = 2901,37.

Příklad 17

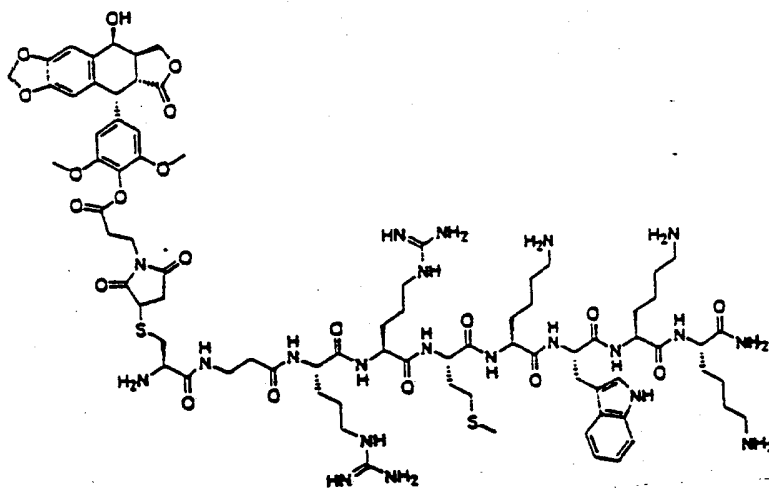
4'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]epipodofyllotoxin



K roztoku 7 mikromol, 4 mg 4'-(maleimidopropionyl)-epipodofyllotoxinu a 6 mikromol, 15 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 0,5 ml DMF se přidá 1 mikrolitr Et₃N. Směs se míchá 40 minut a pak se čistí preparativní RP-HPLC, čímž se ve výtěžku 81 % získá čistý produkt jako 14,1 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 19,7 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2900,4, sumární vzorec C₁₃₅H₁₉₉N₃₇O₃₁S₂ = 2900,39.

Příklad 18

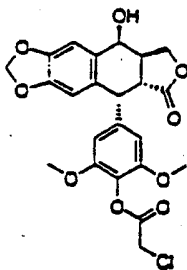
4'-[sukcinimidopropionyl-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]epipodofyllotoxin



K roztoku 14 mikromol, 7,9 mg 4'-(maleimido-propionoyl)epipodofyllotoxinu a 26 mikromol, 31,5 mg H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se přidá 1,2 mikrolitru Et₃N. Směs se 40 minut míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 63 % získá 15,8 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 13,3 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 1757,2, sumární vzorec C₈₀H₁₁₇N₂₁O₂₀S₂ = 1757,05.

Příklad 19

4'-(chloracetyl)epipodofyllotoxin

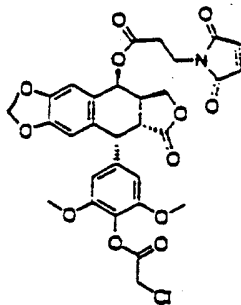


K míchanému roztoku 0,50 mmol, 200 mg 4'-demethyl-epipodofyllotoxinu a 40 mikrolitrů pyridinu ve 2 ml methylenchloridu se při teplotě 0 °C po kapkách přidá 0,50 mmol, 56,5 mg chloracetylchloridu. Podle analytické RP-HPLC se přibližně 60 % výchozího 4'-demethylepipodofyllotoxinu spotřebuje v průběhu 1 hodiny míchání při teplotě 0 °C. Reakční směs se vlije do směsi vody a ledu a výsledná směs se extrahuje methylenchloridem. Organická vrstva se promyje vodou a nasyceným vodným roztokem

chloridu sodného, načež se suší síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se odpaří ve vakuu a odparek se čistí rychlou chromatografií při použití směsi EtOAc/PE v poměru 5:4 až 3:2. Tímto způsobem se ve výtěžku 34 % získá 81,5 mg čistého produktu po překrystalování ze směsi EtOAc/PE jako bezbarvá pevná látka.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 delta: 2,78 (m, 1H, H3), 3,25 (dd, $J = 14,12, 5,07$ Hz, 1H, H2), 3,68 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 4,30 (m, 2H, H11), 4,35 (s, 2H, CH_2Cl), 4,57 (d, $J = 5,12$ Hz, 1H, H1), 4,83 (d, $J = 3,37$ Hz, H4), 5,96 (d, $J = 4,10$ Hz, 2H, OCH_2O), 6,32 (s, 2H, H2'6'), 6,50 (s, 1H, H8), 6,87 (s, 1H, H5).

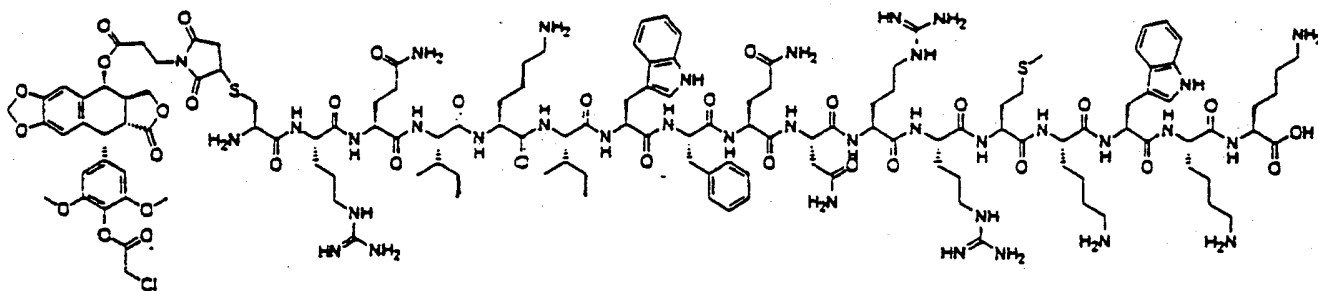
4'-chloracetyl-4-(maleimidopropionoyl)epipodofyllotoxin



Roztok 0,17 mmol, 81,5 mg 4'-(chloracetyl)epipodofyllotoxinu, 0,68 mmol, 115,6 mg kyseliny 3-maleimidopropionové, 0,376 mmol, 47,5 mg DIC, 73 mikromol, 9 mg DMAP a 20 mikrolitrů pyridinu ve 2 ml methylenchloridu se 1 hodinu míchá. Pak se rozpouštědlo odpaří do sucha a výsledná světle žlutá pevná látka se znovu rozpustí v 1 ml DMF a roztok se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 30 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku 51 % získá 54,3 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R =$

22,0 minut; gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 2,71 (t, 2H, $J = 6,80$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Mim}$), 2,98 (m, 1H, H3), 3,25 (dd, $J = 14,20, 5,13$ Hz, 1H, H2), 3,69 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3,87 (t, $J = 6,83$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Mim}$), 3,88 (m, 1H, H11), 4,33 (s, 2H, CH_2Cl), 4,35 (m, 1H, H11), 4,70 (d, $J = 5,10$ Hz, 1H, H1), 6,01 (d, $J = 4,23$ Hz, 2H, OCH_2O), 6,13 (d, $J = 3,50$ Hz, 1H, H4), 6,31 (s, 2H, H2'6'), 6,56 (s, 1H, H8), 6,71 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,92 (s, 1H, H5).

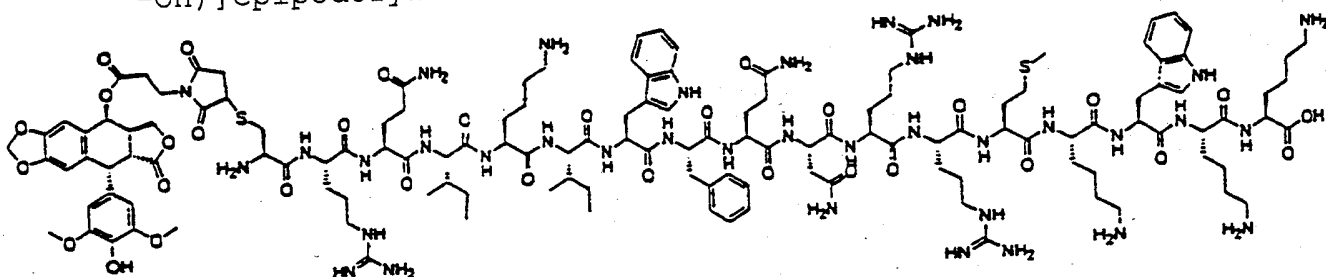
4'-chloroacetyl-4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]epipodofyllotoxin



K roztoku 6,8 mikromol, 43 mg 4'-chloroacetyl-4-(maleimidopropionoyl)epipodofyllotoxinu a 10 mikromol, 25,4 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 1,5 ml DMF se přidá 2,5 mikrolitrů Et_3N . Směs se 30 minut míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku 67 % získá 22 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 16,7$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší

než 99 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2978,3$, sumární vzorec $C_{137}H_{199}ClN_{36}O_{33}S_2 = 2977,85$.

4'-demethyl-4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]epipodofyllotoxin



Roztok 5,5 mikromol, 16,4 mg 4'-chloroacetyl-4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]epipodofyllotoxinu v 1 ml DMF a 0,5 ml vody se při teplotě 0 °C zpracovává působením 20 mikrolitrů koncentrovaného vodného roztoku NH_3 . Po 2 minutách se reakční směs okyselí přidáním 0,1 ml 5% vodného roztoku kyseliny octové. Pak se roztok čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 73 % získá 11,4 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,9$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 99 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2902,2$, sumární vzorec $C_{135}H_{198}N_{36}O_{32}S_2 = 2901,37$.

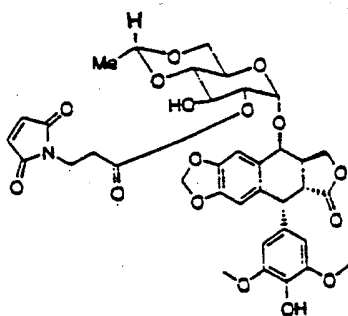
Příklad 20

G2-(maleimidopropionoyl)etoposid, G3-(maleimidopropionoyl)etoposid a 4'-(maleimidopropionoyl)etoposid

Roztok 37,4 mikromol, 22 mg etoposidu, 78 mikromol, 13,2 mg 3-maleimidopropionové kyseliny a 39,6 mikromol,

5 mg DIC ve směsi methylenchloridu a pyridinu v poměru 2:0,15 se míchá 30 minut. Pak se rozpouštědlo odpaří ve vakuu. Výsledná světle žlutá pevná látka se rozpustí v 1,5 ml methanolu a roztok se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se získá 3,4 mg G2-(maleimidopropionoyl)etoposidu, 2,4 mg G3-(maleimidopropionoyl)etoposidu a 7,7 mg 4'-(maleimidopropionoyl)etoposidu ve formě bezbarvých pevných látek, celkový výtěžek je 48 %.

G2-(maleimidopropionoyl)etoposid

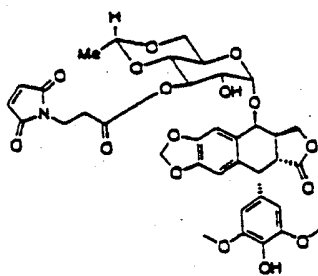


Analytická RP-HPLC: $t_R = 16,7$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 99 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 1,39 (d, $J = 4,99$ Hz, 3H, CH_3), 2,39 (t, $J = 7,30$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Mim}$), 2,87 (m, 1H, H3), 3,14 (dd, $J = 14,20, 5,09$ Hz, 1H, H2), 3,39 (m, 2H, G4,5), 3,63 (m, 2H, G2,6), 3,72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Mim}$), 3,76 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3,84 (t, $J = 8,9$ Hz, 1H, G3), 4,19 (m, 2H, H11, G6), 4,38 (m, 1H, H11), 4,60 (d, $J = 4,10$ Hz, 1H, H4), 4,74-4,84 (m, 2H, H1, G6). 6,00 (d, $J = 5,10$ Hz, 2H, OCH_2O), 6,24 (s, 2H, H2'6'), 6,54 (s, 1H, H8), 6,70 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,75 (s, 1H, H5). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3)

delta: 20,66, 33,48, 33,95, 37,86, 41,46, 44,00, 56,87,
66,75, 68,07, 68,34, 72,15, 74,61, 75,26, 80,24, 100,29,
100,434, 102,07, 108,33, 109,00, 111,33, 128,75, 130,90,
133,40, 134,50, 134,66, 146,80, 147,27, 149,09, 169,94,
170,78, 175,08.

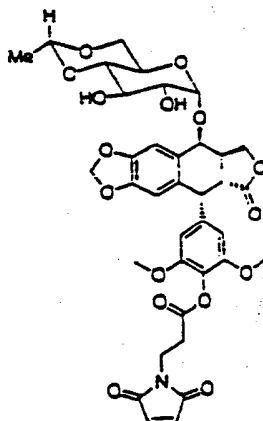
G3-(maleimidopropionoyl)etoposid



Analytická RP-HPLC: $t_R = 18,4$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 99 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 1,33 (d, $J = 5,0$ Hz, 3H, CH_3), 2,74 (t, $J = 7,35$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Mim}$), 2,91 (m, 1H, H3), 3,28 (dd, $J = 14,01, 5,26$ Hz, 1H, H2), 3,38 (m, 2H, G4,5), 3,54 (m, 2H, G2,6), 3,87 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Mim}$), 3,76 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 4,16-4,26 (m, 2H, H11, G3), 4,42 (t, $J = 8,98$ Hz, 1H), 4,61 (d, $J = 5,09$ Hz, 1H, H1), 4,68 (m, 1H, G1), 4,91 (d, $J = 3,34$ Hz, H4), 5,13 (m, 1H, G3). 6,00 (d, $J = 11,25$ Hz, 2H, OCH_2O), 6,26 (s, 2H, H2'6'), 6,54 (s, 1H, H8), 6,71 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,83 (s, 1H, H5). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) delta: 0,67, 33,59, 34,13, 37,93, 41,62, 44,11, 56,84, 66,87, 68,26, 68,38, 73,39, 74,38, 74,49, 100,17, 102,01, 102,54, 108,25, 109,51, 111,10, 128,38, 130,89, 133,28, 134,50, 134,66, 146,84, 147,59, 149,29, 170,64, 170,80, 175,38.

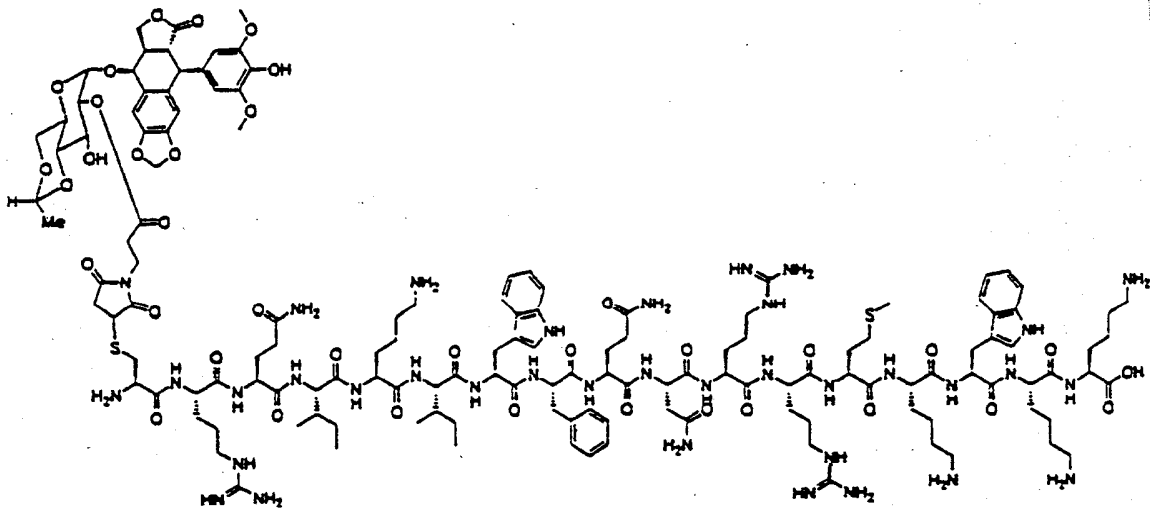
4'-(maleimidopropionoyl)etoposid



Analytická RP-HPLC: $t_R = 17,7$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 99 %.

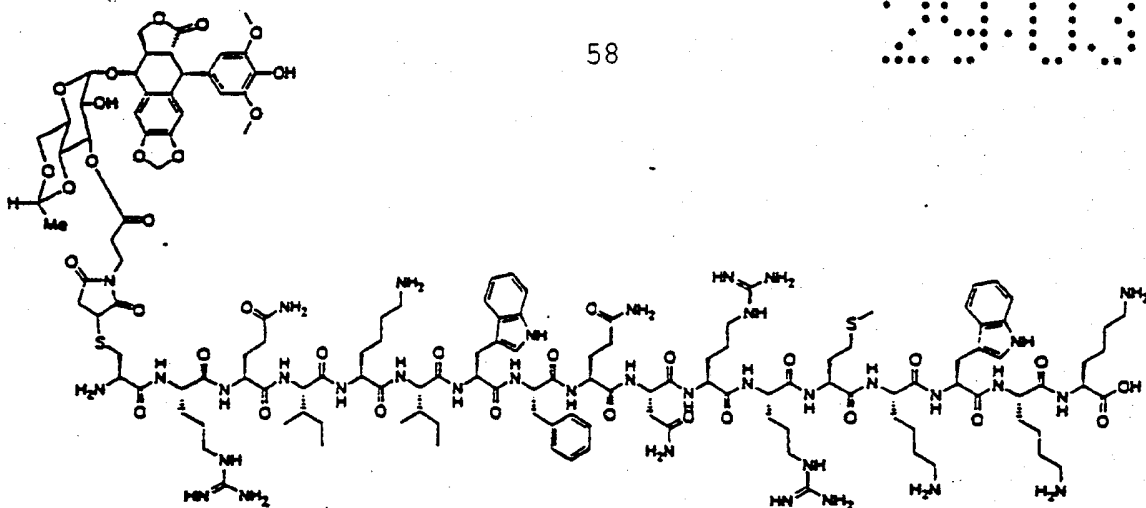
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 1,39 (d, $J = 4,82$ Hz, 3H, CH_3), 2,88 (m, 1H, H3), 2,96 (t, $J = 7,24$ Hz, 2H, CH_2 -Mim), 2,91 (m, 1H, H3), 3,34 (dd, $J = 14,01, 5,26$ Hz, 1H, H2), 3,36 (m, 2H, G4,5), 3,45-3,58 (m, 2H, G2,6), 3,92 (t, $J = 3,20$ Hz, 2H, CH_2 -Mim), 3,65 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3,76 (m, 1H, G3), 4,15-4,27 (m, 2H, H11, G6), 4,43 (m, 1H, H11), 4,62-4,67 (m, 2H, H1, G1), 4,75 (m, 1H, G7), 4,91 (d, $J = 3,27$ Hz, H4), 6,00 (d, $J = 6,68$ Hz, 2H, OCH_2O), 6,25 (s, 2H, H2'6'), 6,54 (s, 1H, H8), 6,71 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,82 (s, 1H, H5). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) delta: 20,62, 32,41, 33,94, 37,87, 41,61, 44,31, 56,52, 66,84, 68,44, 73,47, 74,13, 74,88, 80,06, 100,24, 102,10, 102,30, 107,89, 109,36, 111,22, 128,65, 132,68, 134,61, 138,28, 147,74, 149,29, 151,76, 168,90, 170,76, 175,56.

G2-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]etoposid



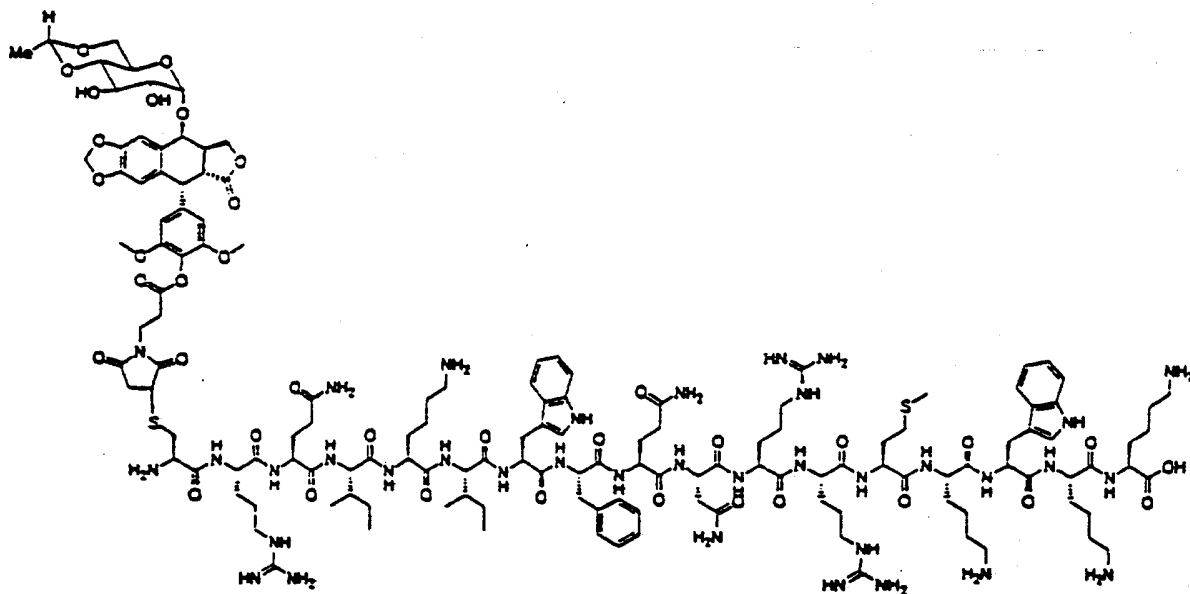
K roztoku 4,4 mikromol, 3,3 mg G2-(maleimido-propionoyl)etoposidu a 5,7 mikromol, 13,4 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 0,5 ml DMF se přidá 0,7 mikrolitrů, 4,9 mikromol Et₃N. Směs se míchá 30 minut, pak se zředí 1 ml 0,1% vodného roztoku TFA a čistí se preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se získá čistý produkt ve výtěžku 80 % jako 10,8 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,6$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 3091,1$, sumární vzorec $C_{143}H_{210}N_{36}O_{37}S_2 = 3089,55$.

G3-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]etoposid



K roztoku 3,1 mikromol, 2,3 mg G3-(maleimido-propionoyl)etoposidu a 4,3 mikromol, 10,2 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 0,5 ml DMF se přidá 0,6 mikrolitru, 4,4 mikromol Et₃N. Směs se 30 minut míchá, pak se zředí 1 ml 0,1% vodného roztoku TFA a čistí se preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 79 % získá 7,4 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,7$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 3090,3$, sumární vzorec $C_{143}H_{210}N_{36}O_{37}S_2 = 3089,55$.

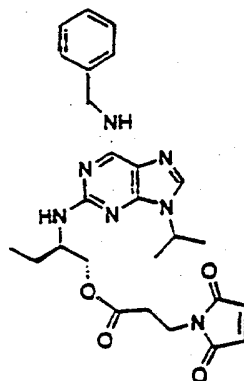
4'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]etoposid



K roztoku 4,8 mikromol, 3,6 mg 4'-(maleimidopropionoyl)etoposidu a 5,9 mikromol, 13,9 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 0,5 ml DMF se přidá 0,7 mikrolitrů, 5,1 mikromol Et₃N. Směs se míchá 30 minut, pak se zředí 1 ml 0,1% vodného roztoku TFA a čistí se preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 77 % získá 11,2 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 14,6 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 99 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 3090,9, sumární vzorec C₁₄₃H₂₁₀N₃₆O₃₇S₂ = 3089,55.

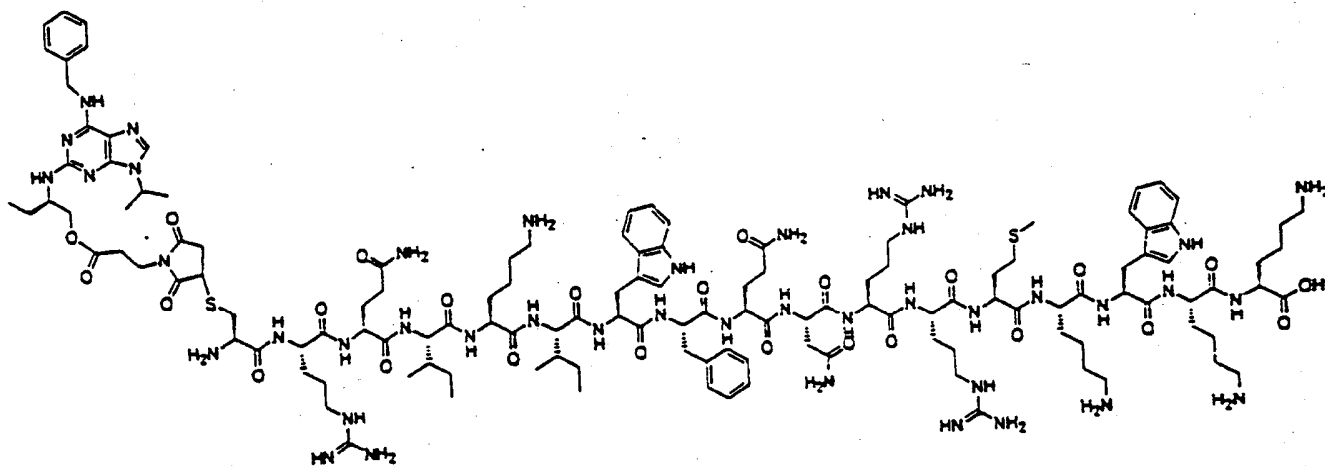
Příklad 21

O-(maleimidopropionoyl)roscovitin



Roztok 29 mikromol, 10,3 mg roscovitinu, 64 mikromol, 10,8 mg kyseliny 3-maleimidopropionové, 35 mikromol, 4,4 mg DIC a 2 mikromol, 0,35 mg DMAP v 1 ml pyridinu se míchá celkem 40 minut. Pak se rozpouštědlo odpaří ve vakuu a výsledná světle žlutá pevná látka se znovu rozpustí v methylenchloridu, roztok se promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného a vysuší se síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se odpaří, čímž se ve výtěžku 96 % získá 14,1 mg produktu ve formě světle žluté pevné látky. Tento materiál se užije pro následující reakci bez dalšího čištění.

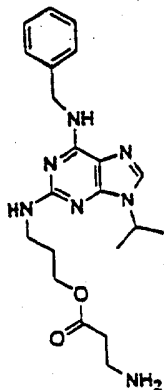
O-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-
-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]roscovitin



K roztoku 28 mikromol, 14,1 mg O-(maleimido-
propionoyl)roscovitinu a 14,9 mikromol, 35 mg H-Cys-Arg-
-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-
Lys-OH v 1,5 ml DMF se přidají 2 mikrolitry, 14,5
mikromol Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá a pak se čistí
preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 60 %
MeCN, čímž se získá 7,2 mg čistého produktu jako bezbarvá
pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,5 minut,
gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE
MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2856,1, sumární vzorec
C₁₃₃H₂₀₄N₄₂O₂₅S₂ = 2855,44.

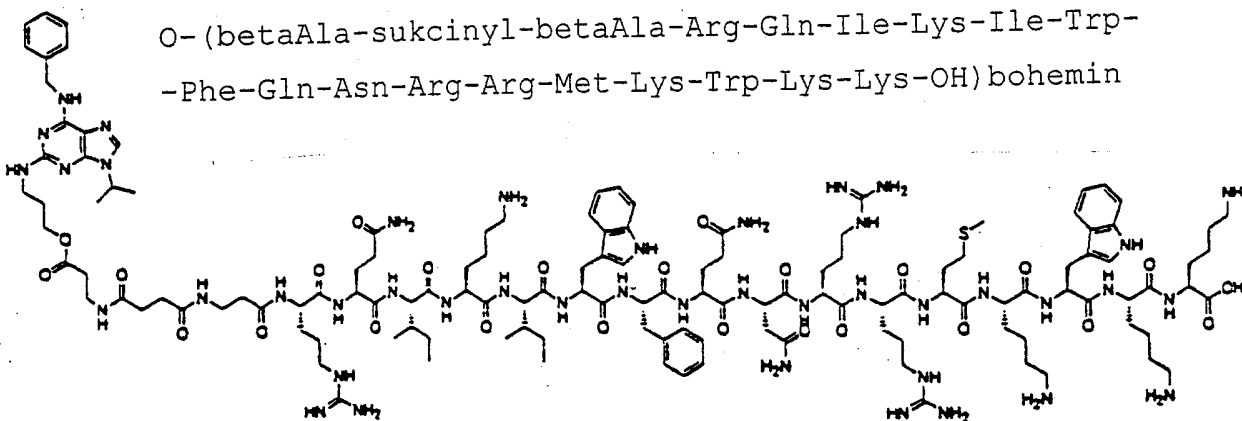
Příklad 22

O-betaAla-bohemin



Roztok 58,8 mikromol, 20 mg boheminu, 0,128 mmol, 24,2 mg Boc-betaAla-OH, 79 mikromol, 8,8 mg DIC a 9,8 mikromol, 1,2 mg DMAP ve 2 ml methylenchloridu se míchá 2,5 hodiny. Pak se rozpouštědlo odpaří ve vakuu a výsledná bílá pevná látka se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se získá 30 mg O-(Boc-betaAla)boheminu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 19,8 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 99 %. Roztok 7,6 mg O-(Boc-betaAla)boheminu v 1 ml směsi TFA a vody v poměru 9:1 se míchá 1 hodinu. Pak se rozpouštědlo odpaří do sucha a odparek se použije pro následující reakci bez dalšího čištění, čistota výsledné látky při analytické RP-HPLC byla vyšší než 98 %.

O-(betaAla-sukcinyln-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)bohemín

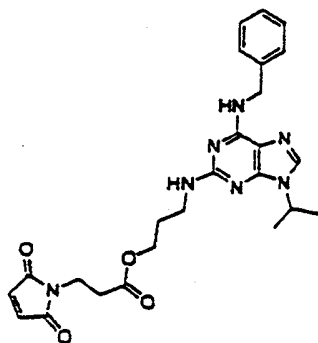


Směs 14,9 mikromol, 81,7 mg sukcinyl-betaAla-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice, 14,9 mikromol, 7,6 mg O-betaAla-

boheminu, 14,9 mikromol, 7,8 mg PyBOP, 14,9 mikromol, 2,4 mg HOBt a 0,2295 mmol, 29,7 mg DIEA ve 2 ml DMF se 2 hodiny míchá. Peptidylová pryskyřice se odfiltruje, promyje se DMF, CH_2Cl_2 a Et_2O a pak se suší ve vakuu, získá se celkem 82 mg pryskyřice, která se 2 hodiny zpracovává působením 5 ml činidla pro odštěpení. 42 mg surového produktu se získá vysrážením Et_2O a odstředěním a slitím supernatantů. Produkt se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se získá 14,3 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,8$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 93 %. DE MALDI-TOF MS: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 2812,7$, sumární vzorec $\text{C}_{132}\text{H}_{204}\text{N}_{42}\text{O}_{25}\text{S} = 2811,37$.

Příklad 23

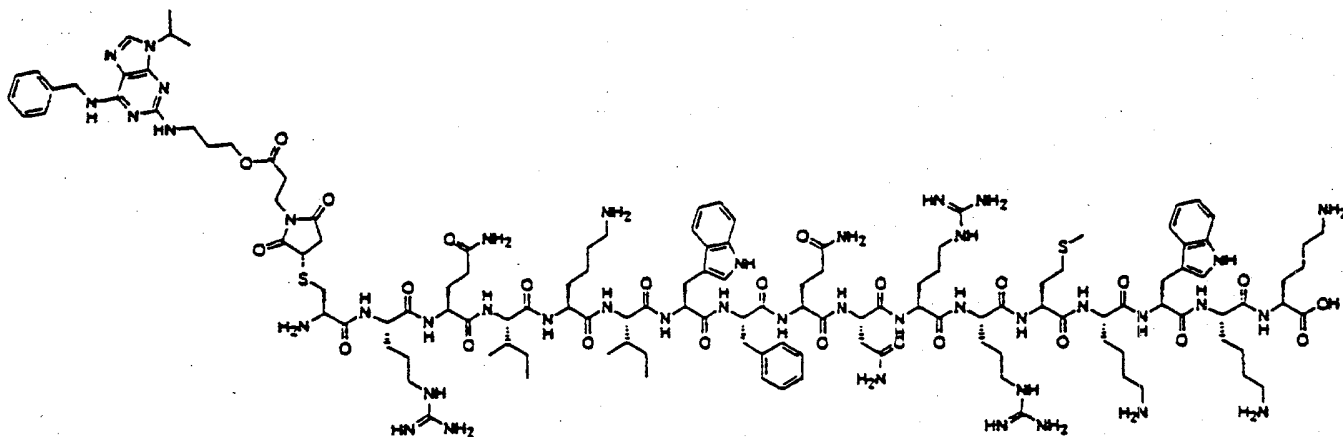
(maleimidopropionoyl)bohemín



12,8 mg, 76 mikromol kyseliny 3-maleimidopropionové se rozpustí v 1 ml methylenchloridu. Směs se míchá a přidává se 5,3 mg, 42 mikromol DIC v 0,5 ml methylenchloridu. Reakce se nechá probíhat za stálého míchání 40 minut. Pak se rozpouštědlo odpaří za sníženého tlaku. Odparek anhydridu kyseliny 3-maleimidopropionové se znovu rozpustí v 0,5 ml bezvodého pyridinu. Přidá se roztok 10,3 mg, 30 mikromol boheminu a 0,35 mg, 2

mikromol DMAP v 0,5 ml pyridinu a směs se ještě hodinu míchá pod dusíkem. Pak se směs odpaří do sucha za sníženého tlaku. Odparek se znovu rozpustí v 1 ml DMF a roztok se čistí preparativní RP-HPLC na sloupci při použití gradientu 10 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 88 % získá čistý produkt jako 14,7 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 17,7$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) a DE MALDI-TOF MS byly v souladu s předpokládanou strukturou výsledné látky. Sumární vzorec $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_4 = 491,54$.

O-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]bohemín

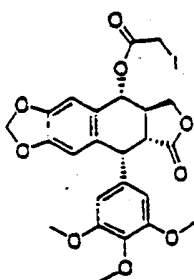


0,74 mg, 1,5 mikromol (maleimidopropionoyl)bohemínu se rozpustí v 0,3 ml DMF a přidá se 50 mikrolitrů Et_3N . Pak se přidá ještě roztok 3,5 mg, 1,5 mikromol H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 0,25 ml DMF. Směs se míchá pod dusíkem a průběh reakce se sleduje analytickou RP-HPLC. Po jedné hodině je reakce ukončena. Směs se zfiltruje a výsledný produkt se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až

60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 40 % získá čistý produkt jako 1,7 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,0 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2842$, sumární vzorec $C_{132}H_{202}N_{42}O_{25}S_2 = 2841,42$.

Příklad 24

4-(jodacetyl)podofyllotoxin

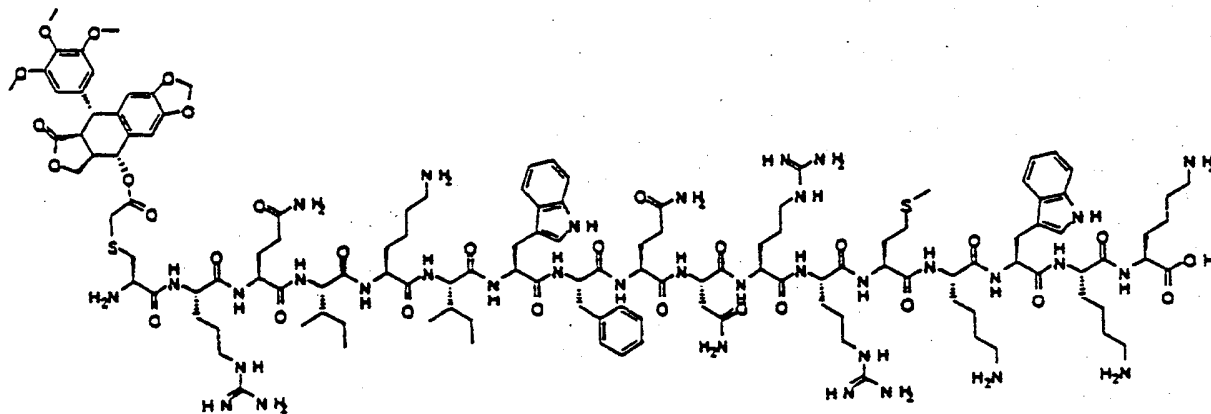


Směs 0,49 mmol, 204 mg podofyllotoxinu, 1,03 mmol, 192 mg kyseliny jodoctové, 0,552 mmol, 69,7 mg DIC a 0,164 mmol, 20 mg DMAP v 5 ml bezvodého methylenchloridu se zchladí na 0 °C. Přidá se 0,2 ml pyridinu a reakční směs se 1 hodinu míchá při teplotě 0 °C. Pak se směs odpaří do sucha. Výsledný světle žlutý odparek se znovu rozpustí v MeCN a čistí se preparativní RP-HPLC při použití gradientu 20 až 70 % MeCN, čímž se získá 89,5 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 22,3$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) delta: 2,85 (m, 2H, H_{2,3}), 3,70 (s, 6H, OCH₃x2), 3,72 (s, 2H, CH₂I), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 4,13 (m, 1H, H₁₁), 4,34 (m, 1H, H₁₁), 4,53, (d, 1H, J = 3,60 Hz, H₁), 5,83 (d, 1H, J = 8,43 Hz, H₄), 5,93 (dd, 2H, J = 4,35, 1,17 Hz, OCH₂O), 6,31 (s, 2H, H_{2'6'}), 6,48

(s, 1H, H8), 6,77 (s, 1H, H5).

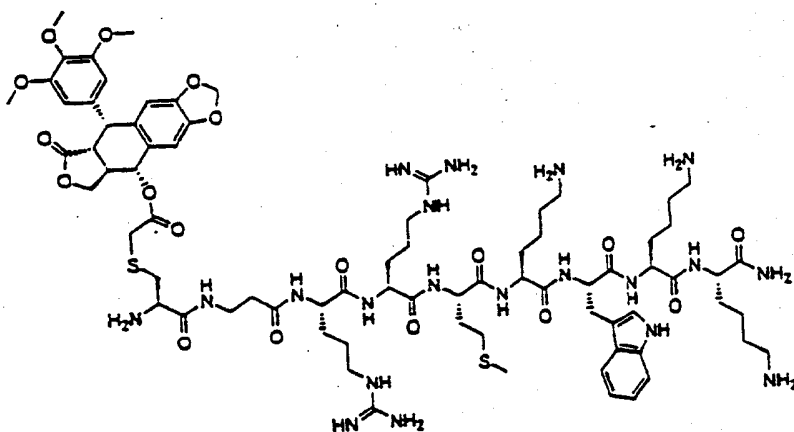
4-[acetyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]podofyllotoxin



K roztoku 17 mikromol, 10 mg, 4-(jodacetyl)podofyllotoxinu a 6 mikromol, 14 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v 1 ml DMF se přidá 0,9 mikrolitrů, 6 mikromol Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá, pak se přidá 0,5 ml MeCN a roztok se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 59 % získá 9,9 mg čistého produktu jako bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,4 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2806,8, sumární vzorec C₁₃₁H₁₉₅N₃₅O₃₀S₂ = 2804,30.

Příklad 25

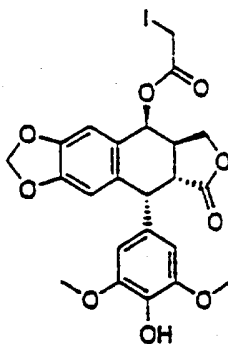
4-[acetyl-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]podofyllotoxin



Roztok 17 mikromol, 10 mg 4-(jodacetyl)podofyllo-
toxinu a 23 mikromol, 28,6 mg H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-
-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se přidá 2,4 mikrolitru,
17 mikromol Et₃N. Směs se l hodinu míchá, pak se přidá
0,15 ml MeCN a směs se čistí preparativní RP-HPLC při
použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku
100 % získá 29,4 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná
látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 14,1 minut, gradient 0 až
60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M +
H]⁺ = 1661,0, sumární vzorec C₇₆H₁₁₄N₂₀O₁₈S₂ = 1659,97.

Příklad 26

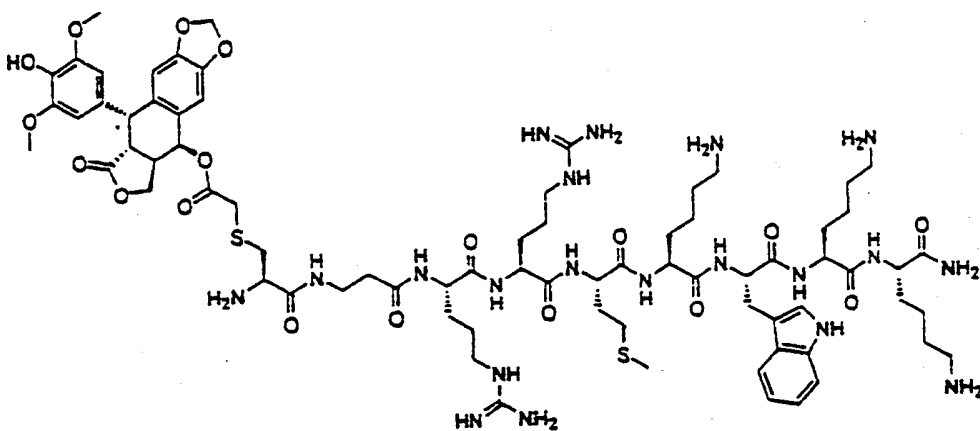
4'-demethyl-4-(jodacetyl)epipodofyllotoxin



K roztoku 0,26 mmol, 104 mg 4'-demethylepipodofyllo-
toxinu, 0,53 mmol, 98,8 mg kyseliny jodoctové a 0,32
mmol, 40,1 mg DIC ve dvou ml methylenchloridu se při
teplotě 0 °C přidá 50 mikrolitrů pyridinu a 0,1 mmol,
12,8 mg DMAP. Směs se 1 hodinu míchá a pak se
rozpuštědlo odpaří. Odparek se rozpustí v 1 ml DMF a
roztok se čistí preparativní RP-HPLC při použití
gradientu 20 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 24 % získá
35,7 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky.
Analytická RP-HPLC: $t_R = 20,3$ minut, gradient 0 až 60 %
MeCN, čistota vyšší než 96 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 3,02 (m, 1H, H3), 3,20 (m,
1H, H2), 3,71 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3,63 (s, 2H, CH_2I), 3,74
(s, 3H, OCH_3), 4,05 (m, 1H, H11), 4,27 (m, 1H, H11), 4,60
(d, 1H, $J = 4,94$ Hz, H1), 6,06 (d, 1H, $J = 3,41$ Hz, H4),
5,92 (m, 2H, OCH_2O), 6,21 (s, 2H, H2'6'), 6,49 (s, 1H,
H8), 6,80 (s, 1H, H5).

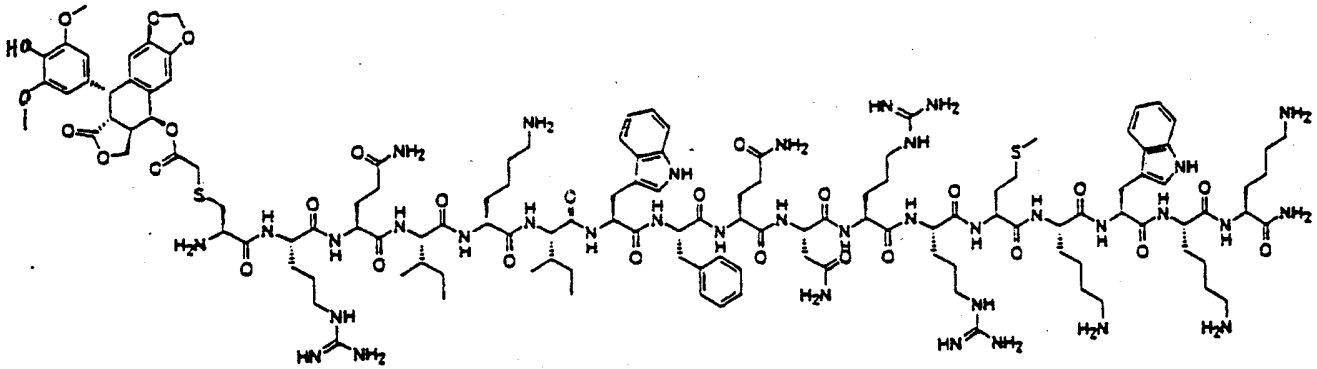
4'-demethyl-4-[acetyl-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-
-Lys-Lys-NH₂)]epipodofyllotoxin



K roztoku 17,6 mikromol, 10 mg 4'-demethyl-4-(jodacetyl)epipodofyllotoxinu a 14,9 mikromol, 18 mg H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se přidá 2,1 ml, 15 mikromol Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá, pak se reakční směs čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 46 % získá 11,2 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 12,8 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 1647,2, sumární vzorec C₇₅H₁₁₂N₂₀O₁₈S₂ = 1645,95.

Příklad 27

4'-demethyl-4-[acetyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]epipodofyllotoxin

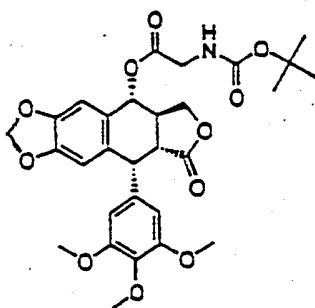


K roztoku 22 mikromol, 12,6 mg 4'-demethyl-4-(jodacetyl)epipodofyllotoxinu a 8 mikromol, 20 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se přidá 1,2 mikrolitrů, 9 mikromol Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 %

MeCN, čímž se ve výtěžku 56 % získá 13,3 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,5$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 96 %. DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2789,5$, sumární vzorec $C_{130}H_{194}N_{36}O_{29}S_2 = 2789,29$.

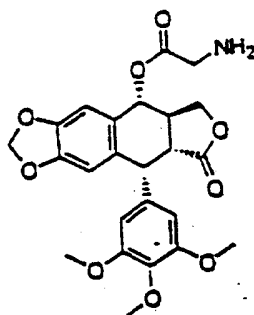
Příklad 28

4-(Boc-Gly)podofyllotoxin



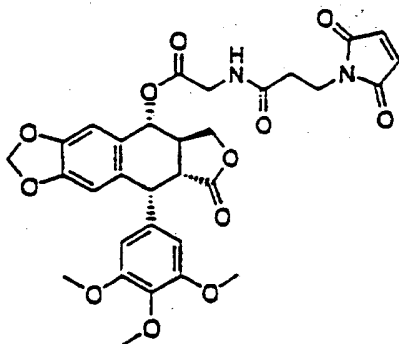
Směs 400 mg, 0,97 mmol podofyllotoxinu, 510 mg, 2,91 mmol Boc-Gly-OH, 1,73 mmol, 273 mikrolitrů DIC, 0,41 mmol, 50 mg DMAP a 173 mikrolitrů pyridnu v 5 ml methylenchloridu se 1 hodinu míchá. Pak se rozpouštědlo odpaří, odparek se znovu rozpustí v 1,5 ml DMF a čistí pomocí RP-HPLC při použití gradientu 20 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku 91 % získá 502,6 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 22,1$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %.

4-(H-Gly)podofyllotoxin



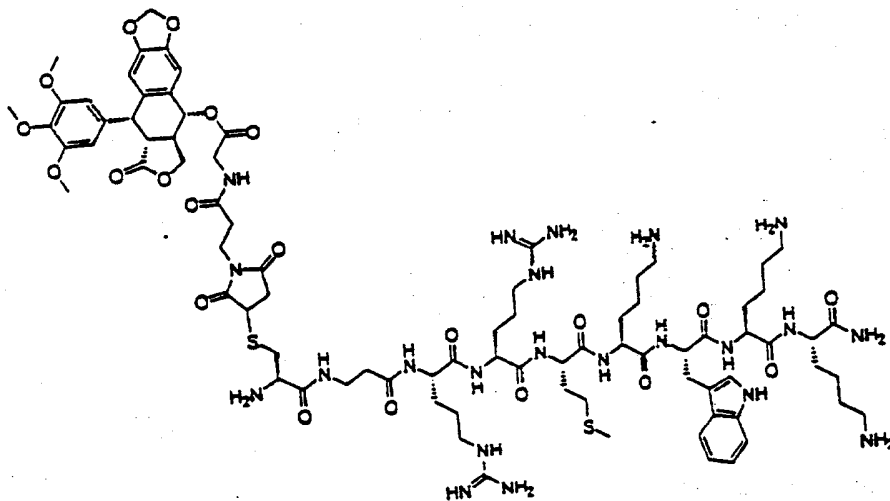
K roztoku 0,24 mmol, 137 mg 4-(Boc-Gly)podofyllo-
toxinu v 8 ml methylenchloridu se přidá 0,5 ml TFA. Směs
se 1 hodinu míchá a pak se rozpouštědlo odpaří. Výsledný
světle žlutý pevný odparek se čistí preparativní RP-HPLC
při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku
37 % získá 41,7 mg čistého produktu ve formě bezbarvé
pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 15,2$ minut,
gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %.

4-(maleimidopropionoyl-Gly)podofyllotoxinu



K roztoku 70 mikromol, 11,8 mg kyseliny 3-
maleimidopropionové a 38 mikromol, 4,83 mg DIC v 1 ml DMF
se přidá 17 mikromol, 8 mg, 4-(H-Gly)podofyllotoxinu,
10 mikromol, 1,2 mg DMAP a 20 mikrolitrů pyridinu. Směs
se 1 hodinu míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při
použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se získá 1,1 mg
čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická
RP-HPLC: $t_R = 18,2$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN,
čistota vyšší než 97 %.

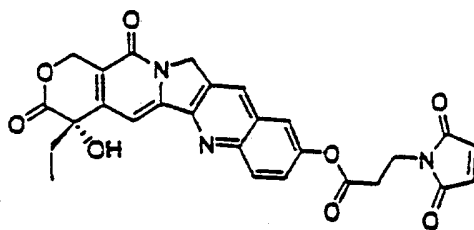
4-[(sukcinimidopropionoyl-Gly)-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-
-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]podofyllotoxin



K roztoku 1,8 mikromol, 1,1 mg 4-(maleimido-
propionoyl-Gly)podofyllotoxinu a 4 mikromol, 5 mg H-Cys-
-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se
přidá 0,5 mikrolitrů, 4 mikromol Et₃N. Směs se 1 hodinu
míchá, pak se zředí 0,5 ml MeCN a čistí preparativní RP-
HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve
výtěžku 33 % získá 1,1 mg výsledné látky v bezbarvé pevné
formě. Analytická RP-HPLC: t_R = 14,7 minut, gradient 0 až
60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %. DE MALDI-TOF MS: [M +
H]⁺ = 1829,8, sumární vzorec C₈₃H₁₂₂N₂₂O₂₁S₂ = 1828,12.

Příklad 29

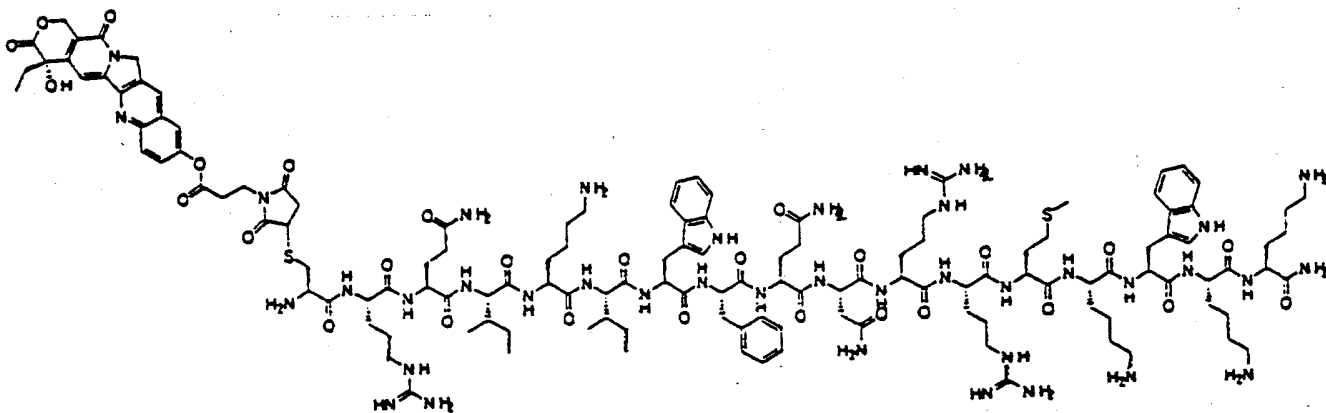
10-O-(maleimidopropionoyl) camptothecin



K roztoku 40 mikromol, 14,7 mg 10-hydroxycamptothecinu, 0,228 mmol, 38,5 mg kyseliny 3-maleimidopropionové a 0,125 mmol, 15,8 mg DIC ve 2 ml methylenchloridu se přidá 0,2 ml pyridinu. Směs se 1 hodinu míchá a pak se odpaří do sucha. Výsledná světle žlutá pevná látka se znovu rozpustí v 1 ml DMF a čistí se preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku 45 % získá 9,2 mg čistého produktu jako světle žlutá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 15,7$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 1,05 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_3), 1,91 (m, 2H, $J = 7,8$ Hz, CH_2), 2,98 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, CH_2), 4,04 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, CH_2), 5,32 (m, 3H, H5, H17), 6,77 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7,60 (m, 1H, H11), 7,72 (m, 2H, H14, H9), 8,24 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H12), 8,36 (s, 1H, H7).

10-O-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-
-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-
- NH_2)]camptothecin



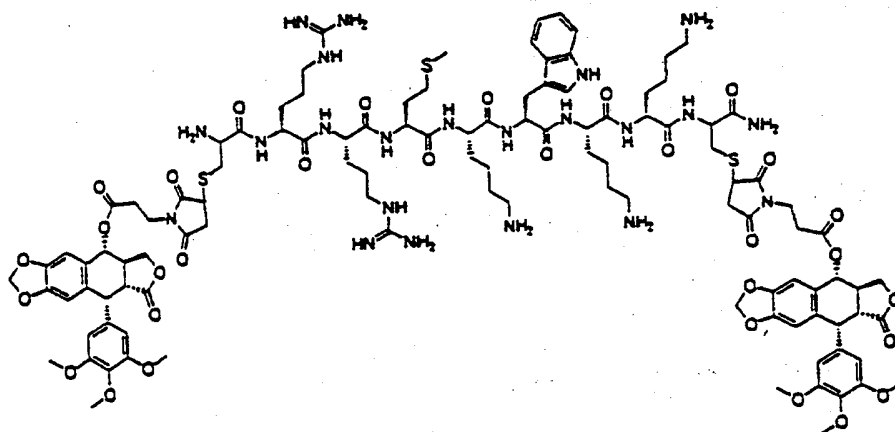
K roztoku 9 mikromol, 4,6 mg 10-O-(maleimido-propionoyl)camptothecinu a 4 mikromol, 10 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se přidá 0,55 mikrolitrů, 4 mikromol Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 57 % získá 6,5 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 14,0 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2864,7, sumární vzorec C₁₃₄H₁₉₅N₃₉O₂₈S₂ = 2864,36.

Příklad 30

H-Cys-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Cys-NH₂

Vychází se z 0,69 mmol/g pryskyřice Rink Amide AM a připraví se H-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Cys(Trt)-pryskyřice. Po odstranění ochranných skupin v průběhu 1,5 hodiny se získá surový peptid vysrážením z Et₂O, odstředěním, slitím supernatantu a usušením. Podíly s celkovou hmotností 258 mg se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 9 až 19 % MeCN, čímž se získá 132,4 mg čistého produktu. Analytická RP-HPLC: t_R = 20,3 minut, gradient 8 až 18 % MeCN, čistota vyšší než 99 %, lambda = 214 nm. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 1238,6, sumární vzorec C₅₂H₉₂N₂₀O₉S₃ = 1237,63.

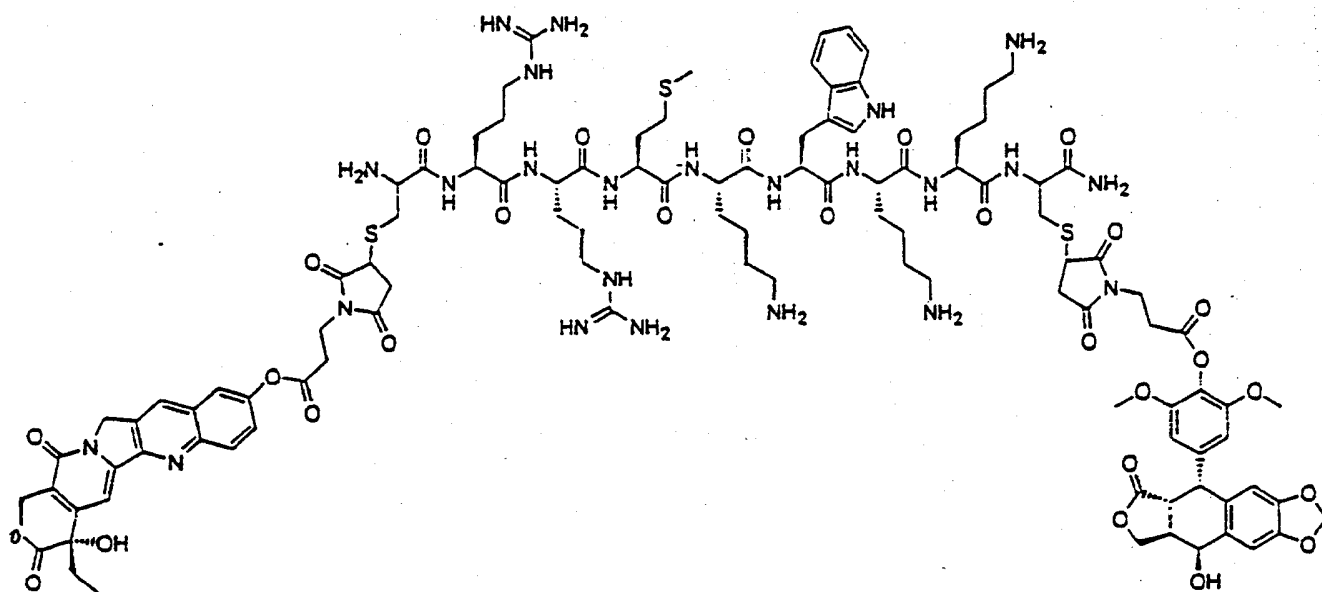
Bis-[4-(sukcinimidopropionoyl)podofyllotoxin]-(H-Cys-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Cys-NH₂)



K roztoku 19 mikromol, 11 mg 4-(maleimidopropionoyl)podofylotoxinu a 12 mikromol, 15 mg H-Cys-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Cys-NH₂ v 1 ml DMF se přidá 2,8 mikrolitru Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku 32 % získá čistý produkt jako 9,0 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 17,4 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2369,7, sumární vzorec C₁₁₀H₁₄₆N₂₂O₃₁S₃ = 2368,66.

Příklad 31

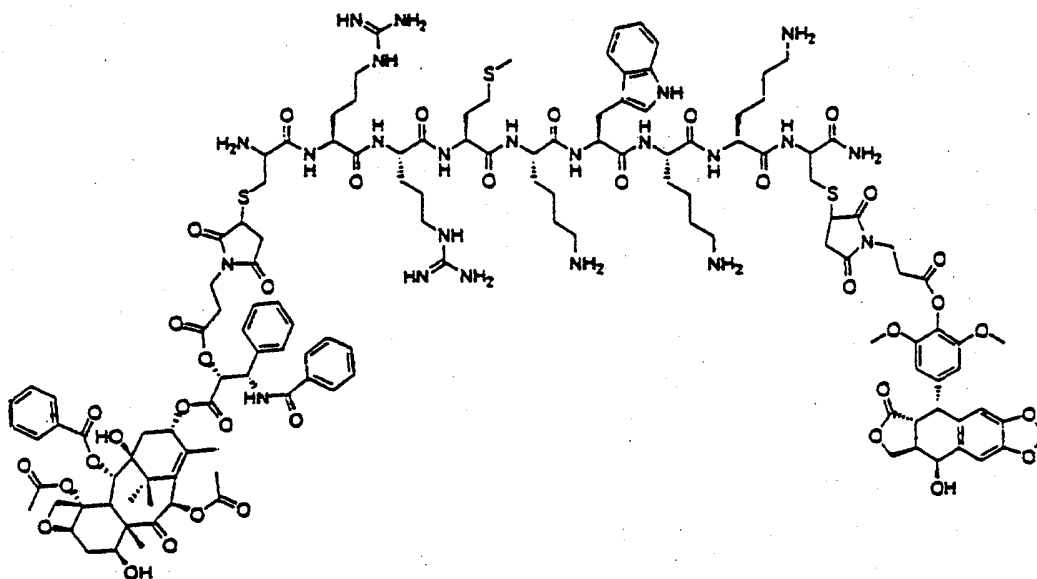
4'-(sukcinimidopropionoyl)epipodofyllotoxin-(H-Cys-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Cys-NH₂)-10-O-(sukcinimidopropionoyl)camptothecin



K roztoku 0,005 mmol, 2,6 mg 10-O-(maleimidopropionyl)camptothecinu, 5,6 mikromol, 3,1 mg 4'-(maleimidopropionyl)epipodofylotoxinu a 11 mikromol, 13 mg H-Cys-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Cys-NH₂ v 1,5 ml DMF se přidá 1,5 mikrolitrů Et₃N. Směs se 1,5 hodiny míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se získá 1,9 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 14,8 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 96 %.
DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2304,6, sumární vzorec
C₁₀₇H₁₃₈N₂₄O₂₈S₃ = 2304,58.

Příklad 32

4'-(sukcinimidopropionyl)epipodofyllotxin-(H-Cys-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Cys-NH₂)-2'-(sukcinimidopropionyl)paclitaxel



K roztoku 2 mikromol, 3,5 mg 4'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Cys-NH₂)]epipodofyllotoxinu, 2 mikromol, 2 mg 2'-(maleimidopropionyl)-paclitaxelu v 1 ml DMF se přidá 0,3 mikrolitru Et₃N. Směs se míchá 1,5 hodiny a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se získá 1,5 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 17,8 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 2794,5, sumární vzorec C₁₃₄H₁₇₃N₂₃O₃₇S₃ = 2794,14.

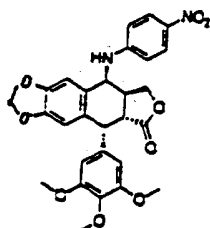
Příklad 33

4'-methoxy-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxin a
4'-demethyl-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxin

Roztok 3,6 mmol, 1,5 g podofyllotoxinu v 15 ml ethylendichloridu se udržuje na teplotě 0 °C a současně se nechá roztokem procházet plynný bromovodík. Po 45 minutách se reakční směs propláchne dusíkem k odstranění přebytečného bromovodíku. Pak se k roztoku přidá 4,32

mmol, 0,85 g bezvodého uhličitanu barnatého a 4,32 mmol, 0,6 g 4-nitroanilinu. Směs se míchá ještě 18 hodin pod dusíkem při teplotě místnosti. Pak se směs zředí ethylacetátem a zfiltruje. Filtrát se promyje vodou, vysuší se síranem hořečnatým a čistí rychlou chromatografií při použití směsi methylenchloridu, ethylacetátu a acetonu v poměru 10:5:5, čímž se získá surový 4'-methoxy-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxin a 4'-demethyl-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxin. Dalším čištěním preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, se získají čisté produkty jako žluté pevné látky.

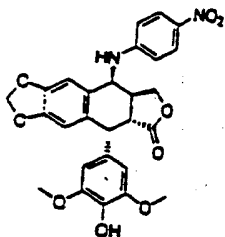
4'-methoxy-4-(4''-nitroanilino)epipodofyllotoxin



Analytická RP-HPLC: $t_R = 22,3$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 3,09 (m, 2H, H_{2,3}), 3,77 (s, 6H, OCH₃), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,86 (m, 1H, H₁₁), 4,42 (m, 1H, H₁₁), 4,63 (m, 2H, H_{1,4}), 4,84 (m, 1H, NH), 6,00 (m, 2H, OCH₂O), 6,31 (s, 2H, H_{2',6'}), 6,57 (m, 3H, H₈, Ar), 6,76 (s, 1H, H₅), 8,16 (d, 2H, J = 9,08 Hz, Ar).

4'-demethyl-4-(4''-nitroanilino)epipodofyllotoxin

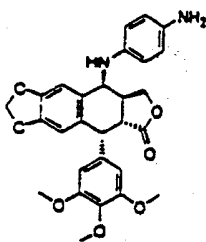


Analytická RP-HPLC: $t_R = 20,5$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 3,07 (m, 2H, H_{2,3}), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,81 (m, 1H, H₁₁), 4,40 (m, 1H, H₁₁), 4,60 (m, 2H, H₁), 4,73 (m, 1H, H₄), 4,83 (m, 1H, NH), 5,45 (br, 1H, OH), 5,98 (m, 2H, OCH₂O), 6,31 (s, 2H, H_{2',6'}), 6,57 (m, 3H, H₈, Ar), 6,76 (s, 1H, H₅), 8,14 (d, 2H, J = 9,04 Hz, Ar).

K roztoku 4'-methoxy-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxinu a 4'-demethyl-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxinu v poměru 10:1 ve směsi ethylacetátu a methanolu se přidá 10% paladium na aktivovaném uhlí. Směs se míchá 3 hodiny ve vodíkové atmosféře. Pak se katalyzátor odfiltruje a několikrát se promyje methanolem. Filtráty a promývací kapalina se spojí a odpaří do sucha, čímž se získá světle žlutá pevná látka, která se znovu rozpustí v MeCN a čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se získají výsledné látky jako žluté pevné látky v kvantitativním výtěžku.

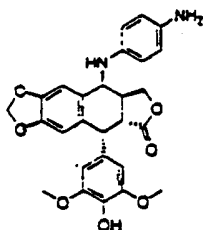
4'-methoxy-4-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxin



Analytická RP-HPLC: $t_R = 16,1$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 2,87 (m, 1H, H3), 3,11 (m, 1H, H2), 3,68 (s, 6H, OCH_3), 3,73 (s, 3H, OCH_3), 3,61 (m, 1H, H11), 4,15 (m, 1H, H11), 4,52-4,62 (m, 2H, H1,4), 5,86 (m, 2H, OCH_2O), 6,28 (s, 2H, H2',6'), 6,37 (m, 2H, Ar), 6,45 (s, 1H, H8), 6,69 (s, 1H, H5), 7,03 (m, 2H, Ar).

4'-demethyl-4-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxin

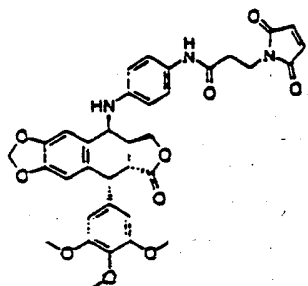


Analytická RP-HPLC: $t_R = 14,2$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 97 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 3,05 (m, 1H, H3), 3,18 (m, 1H, H2), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,93 (m, 1H, H11), 4,38 (m, 1H, H11), 4,60 (d, 1H, $J = 5,91$ Hz, H1), 4,70 (d, 1H, $J = 3,86$ Hz, H4), 5,96 (m, 2H, OCH_2O), 6,33 (s, 2H, H2',6'),

6,53 (s, 1H, H8), 6,62 (d, 2H, J = 8,66 Hz, Ar), 6,75, (s, 1H, H5), 7,19 (d, 2H, J = 8,60 Hz, Ar).

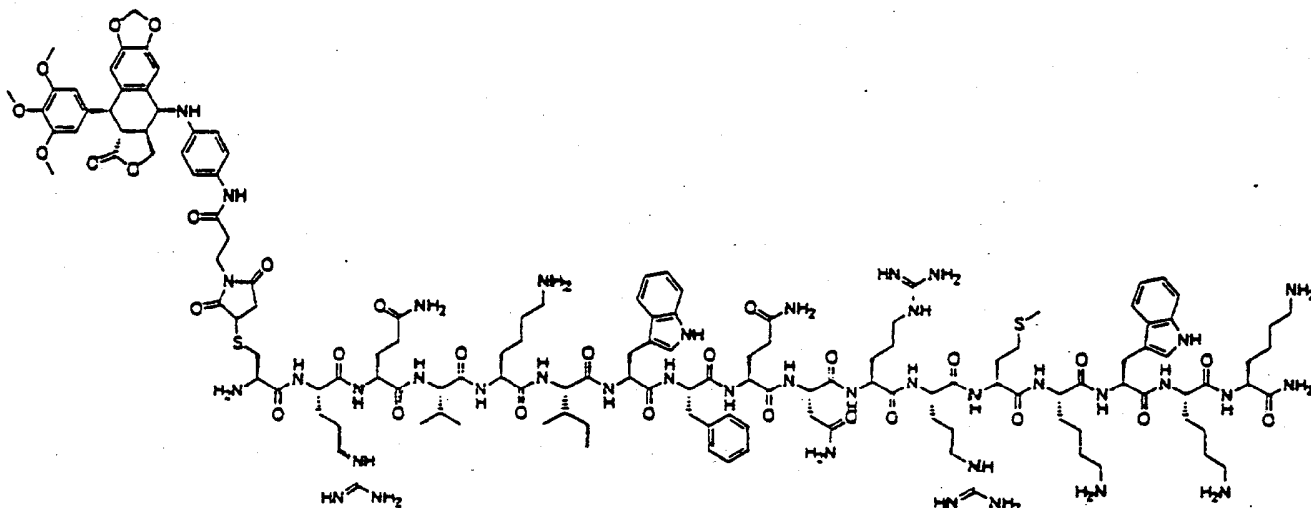
4'-methoxy-4-[4''-aminoanilino-(maleimidopropionoyl)]-epipodofyllotoxin



K roztoku 41 mikromol, 20,8 mg 4'-methoxy-4-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxinu, 0,226 mmol, 38,2 mg kyseliny 3-maleimidopropionové, 0,124 mmol, 15,7 mg DIC a 40 mikromol, 4,9 mg DMAP ve 2 ml methylenchloridu se přidá 0,2 ml pyridinu. Směs se 1 hodinu míchá a pak se odpaří do sucha. Výsledná světle žlutá pevná látka se znovu rozpustí v 1 ml DMF a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 20 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku 38 % získá 10,1 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: $t_R = 19,5$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 96 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 2,71 (t, 2H, J = 7,0 Hz, CH_2), 2,91 (m, 1H, H3), 3,14 (m, 1H, H2), 3,76 (s, 6H, OCH_3), 3,82 (s, 3H, OCH_3), 3,93 (t, 2H, J = 7,0 Hz, CH_2), 3,97 (m, 1H, H5, H11), 3,49 (m, 1H, H11), 4,63 (m, 2H, H1,4), 5,97 (m, 2H, OCH_2O), 6,32 (s, 2H, H2'6'), 6,50 (m, 2H, Ar), 6,53 (s, 1H, H8), 6,73 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,74 (s, 1H, H5), 7,32 (m, 2H, Ar).

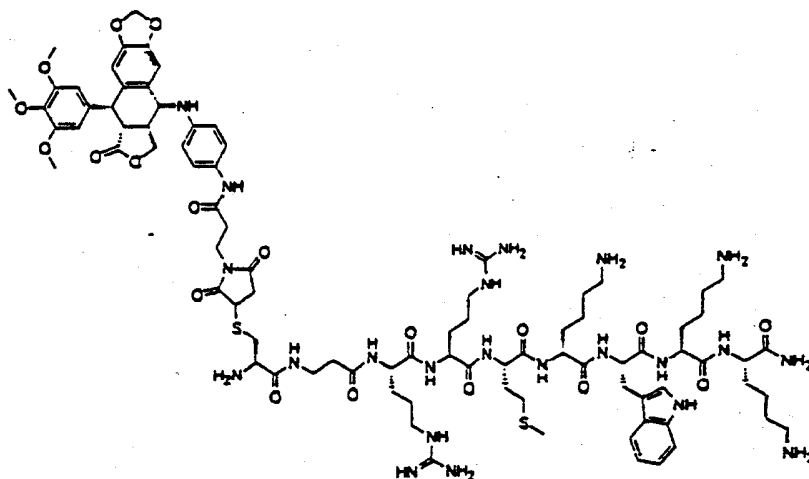
4'-methoxy-4-[4''-aminoanilino-(sukcinimidopropionoyl)-
 -(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-
 -Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]epipodofyllotoxin



K roztoku 6 mikromol, 4,1 mg 4'-methoxy-4-[4''-
 -aminoanilino-(maleimidopropionoyl)]epipodofyllotoxinu a
 6 mikromol, 14 mg H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-
 -Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 ml DMF se
 přidají 2 ml Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá a pak se čistí
 preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 %
 MeCN, čímž se ve výtěžku 32 % získá 5,8 mg čistého
 produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC:
 t_R = 16,0 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší
 než 99 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 3003,9, sumární
 vzorec C₁₄₂H₂₀₇N₃₉O₃₀S₂ = 3004,54.

Příklad 34

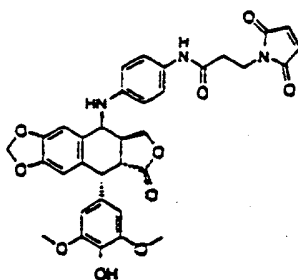
4'-methoxy-4-[4''-aminoanilino-(sukcinimidopropionoyl)-
 -(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-
 -NH₂)]epipodofyllotoxin



K roztoku 7 mikromol, 4,6 mg 4'-methoxy-[4''-aminoanilino-(maleimidopropionoyl)epipodofyllotoxinu a 14 mikromol, 16,3 mg H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1 mikrolitru DMF se přidá 1 ml Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 49 % získá 6,4 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: t_R = 15,2 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 1861,6, sumární vzorec C₈₇H₁₂₅N₂₃O₁₉S₂ = 1861,20.

Příklad 35

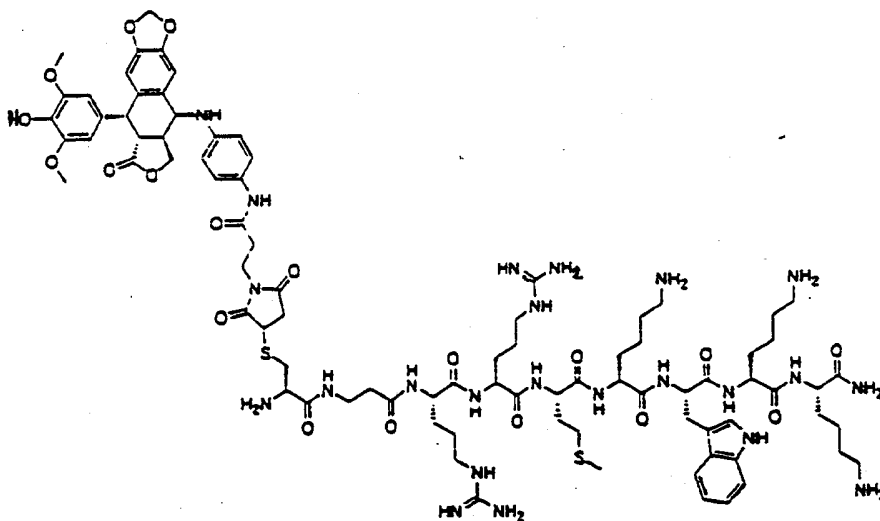
4'-demethyl-4-[4''-aminoanilino-(maleimidopropionoyl)-epipodofyllotoxin



K roztoku 24 mikromol, 12 mg 4'-demethyl-4-(4''-aminoanilino)epipodofyllotoxinu, 49 mikromol, 8,3 mg kyseliny 3-maleimidopropionové a 27 mikromol, 3,4 mg DIC ve 2 ml směsi DMF a methylenchloridu 1:1 se přidá 10 mikrolitrů pyridinu. Směs se 1 hodinu míchá a pak se odpaří. Výsledná světle žlutá pevná látka se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 10 až 70 % MeCN, čímž se ve výtěžku 34 % získá 5,3 mg čistého produktu ve formě bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 19,5$ minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 96 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) delta: 2,65 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH_2), 2,98 (m, 1H, H3), 3,17 (m, 1H, H2), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,93 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2), 3,99 (m, 1H, H5, H11), 4,38 (m, 1H, H11), 4,58 (d, 1H, $J = 4,95$ Hz, H1), 4,64 (d, 1H, $J = 3,95$ Hz, H4) 5,96 (m, 2H, OCH_2O), 6,33 (s, 2H, H2'6'), 6,49-6,53 (m, 3H, H8, Ar), 6,74 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,75 (s, 1H, H5), 7,33 (m, 2H, Ar).

4'-demethyl-4-[4''-aminoanilino-(sukcinimidopropionoyl)-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]epipodofyllotoxin



K roztoku 8,3 mikromol, 5,3 mg 4'-demethyl-[4''-aminoanilino-(maleimidopropionoyl)]epipodofyllotoxinu a 13 mikromol, 15,6 mg H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂ v 1,5 ml DMF se přidají 2 mikrolitry Et₃N. Směs se 1 hodinu míchá a pak se čistí preparativní RP-HPLC při použití gradientu 0 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 97 % získá 14,9 mg čistého produktu jako bezbarvá pevná látka. Analytická RP-HPLC: t_R = 13,7 minut, gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 98 %. DE MALDI-TOF MS: [M + H]⁺ = 1847,1, sumární vzorec C₈₆H₁₂₃N₂₃O₁₉S₂ = 1847,17.

Příklad 36

Cytotoxická účinnost {[4[N-(2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)-N-methylamino]benzoyl]-Glu-Gly-betaAla}₄-Lys₂-Lys-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH in vitro

Svrchu uvedená látka je v následujících tabulkách označována zkratkou MTX-Pen a byla vyhodnocena na svou schopnost vyvolávat inhibici proliferace buněk u normálních (immortalisovaných) lidských buněk, zejména šlo o buňky HaCaT v tabulkách 1 a 2 a také u lidských buněk kolorektálního karcinomu, šlo o buňky HT29 v tabulce 3. Pro srovnání byl jako účinná látka použit methotrexát, označený v tabulkách 1 až 3 zkratkou MTX a volný vektor H-Ala-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH, tento vektor je v tabulce 1 označen zkratkou Pen.

Provedení zkoušky: buňky byly naočkovány do ploten s 96 vyhloubeními v množství 2500 buněk/vyhloubení v prostředí DMEM s 10 % FCS a antibiotiky. Po inkubaci přes noc byly připraveny zkoumané látky v tomtéž prostředí v různém zředění a roztoky byly přidány k buňkám. Pak byly odebrány vzorky 1, 2, 3 a 4 dny po přidání roztoku. Pak bylo přidáno činidlo Nucleotide Releasing Reagent (LumiTech ViaLight) k rozrušení buněk a k uvolnění ATP. Po inkubaci 5 minut při teplotě místnosti byla směs přenesena na opakní plotny s 96 vyhloubeními a plotny byly uloženy až do analýzy při teplotě -20 °C. Pak byly plotny přeneseny do luminometru (Lucy 1, Labtech International) a do každého vyhloubení bylo přidáno činidlo ATP Monitoring Reagent (LumiTech ViaLight) v množství 20 mikrolitrů/vyhloubení a okamžitě byla měřena intenzita světla. Pro každý vzorek bylo provedeno 6 odečtení. Mimo to byly provedeny také příslušné kontroly. Bylo prokázáno, že bioluminiscence ATP byla přímoúměrná počtu životaschopných buněk v průběhu celé škály buněk ve všech vyhloubeních. V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky, přičemž statisticky významné výsledky jsou vyznačeny silnějším tiskem.

Tabulka 1. Buňky HaCaT

Dávka (μ M)	% uhynutí buněk											
	Den 1			Den 2			Den 3			Den 4		
	MTX	MTX-Pen	Pen	MTX	MTX-Pen	Pen	MTX	MTX-Pen	Pen	MTX	MTX-Pen	Pen
40.0	4	29	16	15	82	-22	79	97	5	92	98	12
13.3	22	-42	18	35	63	0	82	97	-17	92	98	-6
4.4	4	-8	8	24	45	-4	77	95	-1	93	98	10
1.5	13	-24	16	31	82	-31	77	82	2	94	88	-14
0.5	-4	-19	6	31	2	-6	75	29	-29	93	49	-26
0.2	7	14	26	11	21	0	79	20	-3	93	51	21

Tabulka 2. Buňky HaCat

Dávka (μ M)	% uhynutí buněk							
	Den 1		Den 2		Den 3		Den 4	
	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen
40.0		42		88		95		94
13.3		27		87		95		94
4.4	21	15	70	52	97	95	92	88
1.5	14	19	67	12	96	-16	91	17
0.5	0	13	59	24	96	-27	91	2
0.2	3		41		94		86	
0.1	19		7		45		65	

Tabulka 3. Buňky HT 29

Dávka (μ M)	% uhynutí buněk							
	Den 1		Den 2		Den 3		Den 4	
	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen
40.0		31		79		96		98
13.3		3		45		88		96
4.4	-14	10	-4	6	58	46	86	77
1.5	17	16	-5	9	48	15	84	45
0.5	15	14	-12	8	52	17	88	16
0.2	10		-5		54		85	
0.1	6		-17		52		84	

Příklad 37

Stabilizace tvorby mikrotubulů působením paclitaxelu a 2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]paclitaxelu

Provedení zkoušky - Roztok tubulinu skotu a tubulinu, značeného tetramethylrhodaminem (celková

koncentrace 0,5 mg/ml) v pufru G-PEM, obsahujícím 80 mM PIPES o pH 6,8, 1 mM EDTA a 1 mM GTP se inkubuje v přítomnosti 10 mikroM paclitaxelu, který je označen A na obr. 1, 10 mikroM 2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]paclitaxelu (B), a to v přítomnosti nebo nepřítomnosti zkoumané látky (C) celkem 30 minut při teplotě 37 °C. Tvorba mikrotubulů byla sledována fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E800. Fotografie byly pořizovány kamerou Kodak DCS 420 (digitální kamera) a byly analyzovány pomocí softwaru Adobe 5.0.

Příklad 38

Internalizace 4-[sukcinimidopropionoyl-(biotinamidokaproyl-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂)]podofyllotoxinu do buněk

Buňky A549 byly naočkovány na plotny s 96 vyhloubeními v množství 50 000 buněk/vyhloubení v prostředí DMEM s 10 % FCS a antibiotiky. Po inkubaci přes noc byly připraveny roztoky 4-[sukcinimidopropionoyl-(biotinamidokaproyl-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂)]podofyllotoxinu (na obr. 2 značení „konjugát“) a biotinamidokaproyl-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂ (na obr. 2 značení „vektor“) jako seriové ředění 6 snižujících se koncentrací v prostředí pro pěstování buněk, roztoky byly přidány do vyhloubení k buňkám. Na konci doby inkubace 60 minut byly buňky 3krát propláchnuty PBS a pak fixovány 20 minut při teplotě

-20 °C směsí ethanolu a kyseliny octové v poměru 95:5. Po fixaci byly buňky 10 minut permeabilisovány působením PBS s obsahem 3 % Tween-20. Endogenní alkalická fosfátaza byla neutralizována inkubací ploten při teplotě 65 °C na dobu 60 minut. Pak byly buňky inkubovány 30 minut při teplotě místnosti s konjugátem alkalické fosfatázy a streptavidinu (Pierce Chemical Co) v 0,1% BSA v PBS, pak byly buňky důkladně promyty PBS. Do každého vyhloubení byl přidán čerstvě připravený roztok 1 mg/ml nitrofenylfosfátu v 10 mM diethanolaminu o pH 9,5 s 0,5 mM chloridu hořečnatého a materiál byl inkubován až do dostatečného vzniku zbarvení, přibližně 30 minut. Enzymatická reakce zastavena přidáním 50 mikrolitrů 2 M vodného roztoku hydroxidu sodného. Aktivita alkalické fosfatázy byla měřena spektrofotometricky při 405 nm.

Příklad 39

Visualizace internalizace 4-[sukcinimidopropionoyl-(biotinamidokaproyl-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂)]podofyllotoxinu do buněk

Buňky byly naočkovány na podložní sklička s 8 vyhloubeními v množství 50 000 buněk na 1 vyhloubení v prostředí DMEM s 10 % fetálního telecího séra a antibiotiky. Po inkubaci přes noc byl v buněčném prostředí rozpuštěn 4-[sukcinimidopropionoyl-(biotinamidokaproyl-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gly-Cys-Gly-NH₂)]podofyllotoxin v koncentraci 10 mikroM a roztok byl přidán k buňkám. Na konci inkubační doby 60 minut byly buňky 3krát promyty PBS a fixovány 20 minut při teplotě

-20 °C směsí ethanolu a kyseliny octové v poměru 95:5. Po fixaci byly buňky permeabilisovány 10 minut prostředím PBS s obsahem 3 % Tween-20. Podložní sklíčka pak byla inkubována 30 minut s konjugátem streptavidinu a FITC (Pierce Chemical Co.) po ředění v PBS při teplotě místnosti, buněčný materiál by důkladně promyt PBS a pak vložen do Hydromount (BDH). Distribuce fluorescence byla analyzována při použití fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E800. Fotografie byly pořizovány pomocí digitální kamery Kodak DCS 420 a analyzovány softwarem Adobe 5.0. Reprezentativní zobrazení je znázorněno na obr. 3.

Příklad 40

Stabilita 4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]podofyllotoxinu

10 x 10⁶ buněk HL60 se inkubuje 1 hodinu s 15 mikrom⁴ 4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]podofyllotoxinu (sloučenina A na obr. 4) v přítomnosti nebo v nepřítomnosti zkoumané látky (B) v prostředí DMEM. Po inkubaci se buněčný materiál důkladně promyje PBS, až již není možno prokázat v promývací kapalině žádnou zkoumanou látku. Pak se buňky inkubují další hodinu s čistým živným prostředím. Pak se buněčný materiál odstředí, usazenina se znovu uvede do suspenze v 50 mM Tris o pH 7,5 s obsahem směsi inhibitorů proteázy, načež se buněčný materiál solubilizuje působením ultrazvuku po dobu 1 minuty. Nerozpustná frakce se odstředí 15 minut při použití Eppendorfovy odstředivky a supernatant se analyzuje pomocí analytické RP-HPLC při

použití gradientu 0 až 60 % MeCN, $\lambda = 254$ nm. Neporušená zkoumaná látka byla identifikována srovnáním s chromatogramy, které byly získány při použití autentické zkoumané látky a pomocí analýzy DE MALDI-TOF MS materiálu, označeného šipkou na obr. 4 a odebraného z hlavních frakcí. Usazeniny byly dále extrahovány DMSO a extrakty byly analyzovány podobným způsobem, přičemž nebyla prokázána žádná zkoumaná látka.

Příklad 41

Stálost peptidových vektorů v séru

Zkoumané látky byly rozpuštěny v prostředí pro pěstování buněk, šlo o 10% FCS v DMEM, v koncentracích v rozmezí 1 až 40 mikrom. Roztoky byly inkubovány při teplotě 37 °C a v různých intervalech byly odebírány vzorky. Po filtraci byly podíly analyzovány pomocí RP-HPLC při použití detektorů UV s fotodiodou. Neporušené vektory byly identifikovány srovnáním s chromatogramy, připravenými při použití autentických peptidů a analýzou DE MALDI-TOF příslušných hlavních frakcí. Poločasy pro 4 různé vektory jsou shrnuty v tabulce 4. Podobné výsledky byly získány v případě, že místo séra skotu, FCS, bylo použito sérum člověka nebo myši. Výhodné je zejména myší sérum vzhledem k tomu, že jsou napodobeny podmínky na buněčných kulturách. Ve všech případech byl hlavním metabolickým produktem peptidu H-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH s 16 zbytky aminokyselin peptid s 15 zbytky aminokyselin, vznikající odštěpením zbytku Lys z C-zakončení. Tento peptid přežívá v séru několik hodin do další degradace na C-zakončení. Vektory peptidové povahy, obsahující L-aminokyseliny byly

degradovány daleko pomaleji a nebylo možno identifikovat jednotlivé metabolity. Všechny peptidové vektory, obsahující D-aminokyseliny byly velmi stálé a obvykle by bylo možno prokázat ještě po 72 hodinách inkubace.

Tabulka 4

Vektor	Sérum $t_{1/2}$
H-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH	10 min
H-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH ₂	> 12 h
H-D-Arg-D-Gln-D-Ile-D-Lys-D-Ile-D-Trp-D-Phe-D-Gln-D-Asn-D-Arg-D-Arg-D-Met-D-Lys-D-Trp-D-Lys-D-Lys-NH ₃	> 24 h
H-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH ₂	3 h

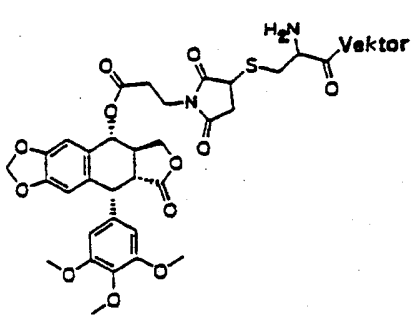
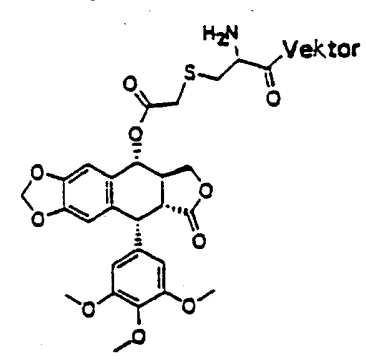
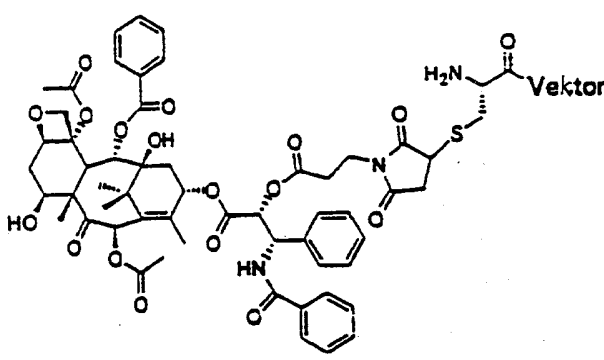
Příklad 42

Stálost vazby účinných látek a esterů v séru

Zkoumané látky, označené v tabulce 5 jako A: 4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]podofyllotoxin, B: 4-[acetyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]podofyllotoxin, C: 2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]paclitaxel se rozpustí v prostředí pro pěstování buněk, 10% FCS v DMEM v koncentraci v rozmezí 1 až 40 mikrom. Roztoky se inkubují při teplotě 37 °C a v určených intervalech se odebírají vzorky. Po filtraci se

podíly těchto vzorků analyzují při použití RP-HPLC a UV detektoru s fotodiodou. Hydrolýza esterových vazeb mezi hydroxyskupinou účinné látky a karboxylovou skupinou linkeru byla sledována průkazem volného podofyllotoxinu nebo paclitaxelu. Poločasy pro tři různé kombinace účinné látky a linkeru jsou shrnuty v tabulce 5. Podobné výsledky byly dosaženy v případě, že místo séra skotu bylo užito lidské sérum nebo sérum myši. Sérum myši je velmi výhodné vzhledem k tomu, že je možno postup provádět v podobných podmínkách, v jakých jsou pěstovány buněčné kultury pro průkaz cytotoxicity.

Tabulka 5

Sloučenina	Struktura	Poločas esterové vazby mezi sloučeninou a linkerem v séru
A		> 24 h
B		40 min
C		> 12 h

Příklad 43

Srovnání cytotoxického účinku paclitaxelu a jeho konjugátů s vektory

Aby bylo možno prokázat cytotoxické biologické účinky na buňky plicního karcinomu A549 a na buněčné linie karcinomu mléčné žlázy MCF7, byly konjugáty paclitaxelu s vektory, a to s vektorem s obsahem 16 zbytků aminokyselin, 2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]paclitaxel a také s vektorem s obsahem 7 zbytků aminokyselin, 2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)]paclitaxel použity ke sledování tak, že buněčný materiál byl vystaven působení uvedených komplexů na 1 hodinu, to znamená na dobu, při níž jsou konjugáty metabolicky stále za podmínek, při nichž je zkouška prováděna, jak je uvedeno v příkladech 41 a 42. Hodnoty IC₅₀ za 1 hodinu a za 3 dny jsou shrnuty v tabulce 6 a jsou srovnány s hodnotami, jichž bylo dosaženo při použití volného paclitaxelu. Je nutno uvést, že vzhledem k zanedbatelné rozpustnosti nekonjugovaného paclitaxelu ve vodě bylo vymývání sloučenin, neinternalizovaných do buněk daleko méně účinné než v případě konjugátů, jejichž rozpustnost ve fyziologických prostředích je větší než 10 mg/ml. Je možno uzavřít, že po 1 hodině působení je cytotoxická účinnost důsledkem přítomnosti neporušených konjugátů paclitaxelu, jak je také zřejmé z příkladu 37.

Provedení zkoušky - Buněčný materiál by naočkován na plotny s 96 vyhloubeními v množství 2500 buněk/vyhloubení v prostředí DMED, obsahujícím 10 % FCS a antibiotika. Po

inkubaci přes noc byly připraveny zkoumané látky v různém ředění v prostředí pro pěstování buněk, v případě volného paclitaxelu byl přidán dimethyl sulfoxid k dosažení alespoň částečného rozpuštění, roztoky byly přidány k buněčnému materiálu. Po 1 hodině působení byla plotna inkubována ještě další hodinu, pak byly odstraněny supernatanty a vyhloubení byla promyta prostředím pro pěstování buněk po dobu 5krát 2 minuty. Po celkové inkubaci 72 hodin bylo kvantitativně stanoveno celkové množství životaschopných buněk při použití standardního postupu MTT.

Tabulka 6

Zkoumaná látka	72 h, IC ₅₀ (mikrom)			
	Buněčná linie			
	A 549		MCF7	
	Doba expozice			
	1 h	3 d	1 h	3 d
Paclitaxel	0,028	<0,015	0,04	<0,015
Paclitaxel-vektor (16-mer)	0,618	<0,015	0,202	0,017
Paclitaxel-vektor (7-mer)	0,043	<0,015	0,325	<0,015

Příklad 44

Vyhodnocení konjugátů paclitaxel-vektor a podofyllotoxin-vektor na buněčných liniích karcinomu

Na buněčné linie bylo působeno sériovým zředěním zkoumaných látek, v tabulce 7 šlo o následující látky: konjugát 2'-paclitaxelu a vektoru, 2'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-

-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]paclitaxel, konjugát 7-paclitaxelu a vektoru, 7-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]paclitaxel a konjugát 4-podofyllotoxinu a vektoru, 4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)]podofyllotoxin. Po inkubaci 96 hodin byla stanovena cytotoxicita při použití standardní zkoušky SRB.

Tabulka 7. Vyhodnocení cytotoxicity na buněčných liniích při době působení 96 hodin, IC₅₀ (mikrom)

Buněčná linie	Vektor	Konjugát 2'-paclitaxel-vektor	Konjugát 7-paclitaxel-vektor	Paclitaxel	Konjugát 4-podofyllotoxin-vektor	Etoposid
BE	> 25	0.0305	1.6	< 0.0025	0.55	1.1
COLO205	> 25	0.074	1.9	0.0026	0.495	0.8
DLD-1	> 25	0.6	25	0.054	0.65	0.57
HCT116	> 25	0.096	2.4	< 0.0025	0.53	1.9
HT29	> 25	0.092	2.25	< 0.0025	0.53	2.6
KM12	> 25	0.105	2.95	0.0028	0.58	0.58
LIM1215	> 25	0.12	3.65	0.0058	1.1	0.33
LS174T	> 25	0.195	7.4	0.0085	1.25	0.46
A2780	> 25	0.105	2.8	< 0.0025	0.54	0.21
A2780Cis ^K	> 25	0.125	4.3	0.0051	0.54	0.68
CH1	> 25	0.115	6.6	0.0041	0.51	0.165
CH1Dox ^K	> 25	4.6	> 25	0.54	0.51	6.6
CH1Taxol ^K	> 25	0.13	8.7	0.0058	0.52	0.145
SKOV-3	> 25	0.235	22	0.01	0.74	13

Příklad 45

Vyhodnocení etoposidových a podofyllotoxinových derivátů na inhibici topoisomerázy II

Zkouška na topoisomerázu II - 0,3 mikrogramu plasmidové DNA se inkubuje při teplotě 37 °C se 4 jednotkami čištěné rekombinantní lidské topoisomerázy II v pufru pro štěpení, který obsahuje 30 mM tris.HCl o pH 7,6, 60 mM NaCl, 3 mM ATP, 15 mM merkaptoethanolu a 8 mM chloridu hořečnatého, bez přidání nebo s přidáním zkoumané látky v konečné koncentraci 1 mM, 100 mikrom nebo 10 mikrom. Reakce se zastaví přidáním SDS do konečné koncentrace 1 % hmotnostní. Vzorky se zpracovávají působením proteinázy K 30 minut při teplotě 37 °C a pak se 2krát extrahují stejným objemem směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 42:1. Po přidání barviva se vzorky nanasou na 4 x TAE, 1% agarózový gel, obsahující 0,5 mg/ml ethidiumbromidu a elektroforéza se nechá probíhat 16 až 24 hodin. Inhibice topoisomerázy II se určuje podle produkce lineární plasmidové DNA a zachyceného meziproduktu štěpení a stanoví se poměr substrátu (šroubovicová DNA) k produktu (uvolněná DNA). Stanovení relaxace se provádí stejným způsobem s tou výjimkou, že reakční pufr se optimalizuje na detekci katalýzy spíše než na detekci štěpení, takže se užijí pouze 2 jednotky enzymu na vzorek. Jako reakční pufr se užije 50 mM tris.HCl o pH 8, 120 mM KCl, 0,5 mM ATP, 0,5 mM dithiothreitolu a 10 mM chloridu hořečnatého. Na inhibici topoisomerázy II je možno usoudit z poměru substrátu (šroubovicová DNA) a produktu (uvolněná DNA).

Tabulka 8

Zkoumaná látka	Účinnost ^a
Etoposid	IC
Podofyllotoxin	-
4'-demethylepipodofyllotoxin	IC
4'-demethyl-4-(4'' aminoanilino)- epipodofyllotoxin	I
H-betaAla-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH ₂	-
4-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-betaAla-Arg- -Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH ₂)]podofyllotoxin	-
4'-[sukcinimidopropionoyl-(H-Cys-betaAla-Arg- -Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-H ₂)]epipodofyllotoxin	IC
4'-demethyl-4-[acetyl-(H-Cys-betaAla-Arg-Arg- -Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH ₂)]epipodofyllotoxin	IC
4'-demethyl-4-[4''-aminoanilino- -(sukcinimidopropionoyl)-(H-Cys-betaAla-Arg- -Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys- -NH ₂)]epipodofyllotoxin	I

a) I znamená inhibici relaxace šroubovicového plasmidu působením topoisomerázy II. C znamená nahromadění reakčního meziproduktu topoisomerázy II.

Zkratky:

Boc terc.butyloxykarbonyl

Bu^t terc.butyl

CF₃COOH kyselina trifluoroctová

CH₂Cl₂ dichlormethan

DE MALDI-TOF MS doba desorbční ionizace matrice v
hmotové spektrometrii, stanovená
laserem

DMF N,N-dimethylformamid

Et₂O diethylether

Fmoc	9-fluorenylmethyloxykarbonyl
HMBA	p-hydroxymethylbenzoyl
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
MeCN	acetonitril
Pmc	2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
Pr ⁱ ₂ NEt	N,N-diisopropylethylamin
PyBOP	benzotriazol-1-yloxytrispyrrolidino-fosfonium-hexafluorofosfát
RP-HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie v reversní fázi
Trt	trityl (trifenylmethyl)

Příklad 1a

H-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-
 -Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-
 -Lys(Boc)-pryskyřice

Peptid byl získán při použití syntetizátoru peptidů ABI 433A (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Byl použit standardní postup („FastMoc 0,25 mmol MonPrevPk“). Výchozí pryskyřicí bylo 0,5 mmol/g pryskyřice Fmoc-Lys(Boc)-[(4-(hydroxymethyl)fenoxycetyl)pryskyřice] (ABI 401425). Výsledná peptidylová pryskyřice, získaná ve výtěžku 100 % a množství 1,37 g byla promyta Et₂O a sušena ve vakuu.

Aby bylo možno prokázat chemickou integritu tohoto meziprojektu, byl malý podíl peptidylové pryskyřice rozštěpen a zbaven ochranných skupin a surový produkt byl analyzován, šlo o H-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH s čistotou vyšší než 90 % při analytické RP-HPLC, totožnost sloučeniny byla

potvrzena metodou DE MALDI-TOF MS a kvantitativní analýzou aminokyselin.

[H-Glu(OBu^t)-Gly-bAla]₄-Lys₂-Lys-bAla-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-
-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-
-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice

137 mg, 0,025 mmol svrchu získané peptidylové pryskyřice se acyluje při použití 47 mg, 0,15 mmol Fmoc-betaAla-OH, 78 mg, 0,15 mmol PyBOP, 25 mg, 0,15 mmol HOBT a 39 mg, 0,225 mmol Prⁱ₂NEt ve 2 ml DMF v průběhu 2 hodin. Pak se skupina Fmoc odštěpí v průběhu 20 minut působením 20% piperidinu v DMF a materiál se důkladně promyje DMF. Produkt se ještě 2krát prodlouží dvojí acylací a odštěpením ochranných skupin při použití Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (0,15 mmol v prvním cyklu a 0,3 mmol ve druhém cyklu) při použití obdobných cyklů vazby a následného odštěpení ochranné skupiny. Pak se řetězec znovu prodlouží při použití 0,6 mmol Fmoc-Gly-OH a 0,6 mmol Fmoc-Glu(OBu^t)-OH, přičemž se opět užijí obdobné stupně acylace a odštěpení ochranné skupiny Fmoc. Pak se produkt zbaví ochranných skupin a důkladně se postupně promyje DMF, CH₂Cl₂ a Et₂O, načež se suší ve vakuu.

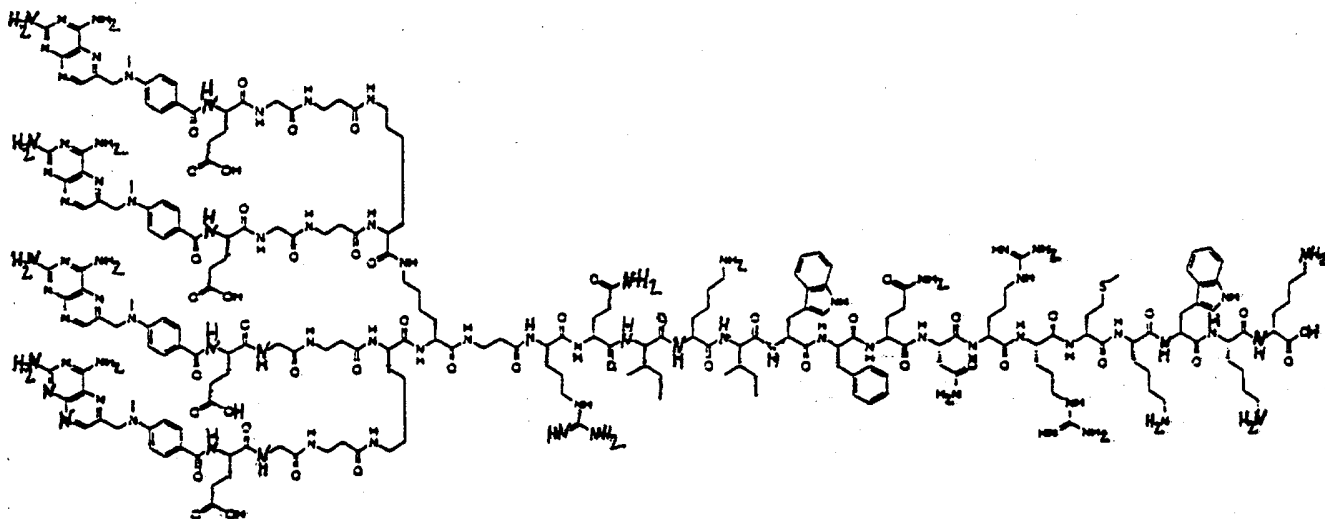
Aby bylo možno prokázat chemickou integritu tohoto meziproduktu, byl malý podíl peptidylové pryskyřice odštěpen a postranní řetězec byl zbaven ochranných skupin, načež byl analyzován surový produkt, [H-Glu-Gly-betaAla]₄-Lys₂-Lys-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH, byla prokázána čistota vyšší než 89 % při RP-HPLC na sloupci Vydac 218TP54, průtok 1 ml/min, 25 °C, gradient 15 až 25 % MeCN v 0,1% vodné CF₃COOH v průběhu 20 minut, t_R = 17,7 minut,

lambda = 200 až 300 nm, identita byla prokázána pomocí DE
MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 3732$, sumární vzorec
 $C_{165}H_{269}N_{53}O_{44}S = 3731,30$.

{ [4[N-(2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)-N-
-methylamino]benzoyl]-Glu(OBu^t)-Gly-betaAla]₄-Lys₂-Lys-
-bAla-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-
-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-
-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice

76 mg, 0,025 mmol svrchu uvedené peptidylové
pryskyřice se nechá reagovat přes noc při teplotě
místnosti s 76 mg 0,2 mmol hemihydrochloridihydrátu
kyseliny [4[N-(2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)-N-
-methylamino]benzoové (Aldrich 86, 155-3), a 104 mg, 0,2
mmol PyBOP, 27 mg, 0,2 mmol HOBt a 70 mikrolitrů, 0,4
mmol Prⁱ₂NEt ve 2 ml DMF. Produkt se postupně promývá
DMF, CH₂Cl₂ a Et₂O, načež se suší ve vakuu, čímž se získá
85 mg výsledné peptidylové pryskyřice jako oranžové pevné
látky.

{ [4[N-(2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)-N-
-methylamino]benzoyl]-Glu-Gly-betaAla]₄-Lys₂-Lys-bAla-
-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-
-Lys-Lys-OH



Svrchu uvedený produkt se zpracovává 1,5 hodiny při teplotě místnosti pomocí činidla, tvořeného fenolem, vodou, thioanisolem, 1,2-ethandithiolem a TFA v poměru 0,75:0,5:0,5:0,25:10. Užije se 12 ml tohoto činidla. Zbytek pryskyřice se pak odfiltruje a promyje na sintru malými podíly čisté kyseliny trifluoroctové. Filtráty a promývací kapalina se spojí, přidá se 100 ml diethyletheru a směs se zchladí. Vysrážený produkt se odstředí a etherový supernatant se slije. Produkt se ještě 3krát promyje podobným způsobem diethyletherem. Výsledný surový produkt se suší ve vakuu, čímž se získá 61 mg oranžového prášku. Tento materiál se znovu rozpustí ve 4 ml 0,1% vodného roztoku kyseliny trifluoroctové a roztok se zfiltruje. Výsledný roztok se ve dvou podílech nanese na sloupec RP-HPLC (Vydac 218TP1022, 22 x 250 mm). Sloupec se vymývá rychlostí 9 ml/min při použití gradientu 17,5 až 27,5 % MeCN v 0,1% vodném roztoku kyseliny trifluoroctové v průběhu 40 minut při teplotě 25 °C. Hlavní frakce se odebírají, sledují pomocí analytické RP-HPLC a spojí podle potřeby. Po odstředění ve vakuu se tímto způsobem získá 13,5 mg čistého produktu. Analytická RP-HPLC: $t_R = 17,8$ minut (Vydac 218TP54, gradient 17,5 až 27,5 % MeCN v 0,1% vodném roztoku kyseliny trifluoroctové, 20 minut, průtok 1 ml/min, 25 °C, čistota vyšší než 99 %, $\lambda = 200$ až 300 nm). DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 4962$, sumární vzorec $C_{225}H_{321}N_{81}O_{48}S = 4960,54$.

Příklad 2a

H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-
-Lys-Trp-Lys-Lys-OH

411 mg, 0,075 mmol H-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-
-Ile-Trp-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-
-Lys(Boc)-Trp-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice se acyluje
působením 264 mg, 0,45 mmol Fmoc-Cys(Trt)-OH, 234 mg,
0,45 mmol PyBOP, 61 mg, 0,45 mmol HOBt a 0,12 ml, 0,675
mmol N,N-diisopropylethylaminu ve 3 ml DMF celkem
3 hodiny. Výsledná peptidylová pryskyřice se promyje po
dobu 3 x 5 minut vždy 25 ml DMF, pak se nechá okapat a
přidá se na 20 minut 20% piperidin v DMF. Po odfiltrování
reakčního činidla se výsledný produkt, kterým je H-
-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Ile-Lys(Boc)-Ile-Trp-Phe-
-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Met-Lys(Boc)-Trp-
-Lys(Boc)-Lys(Boc)-pryskyřice se postupně promyje DMF,
CH₂Cl₂ a Et₂O, načež se suší ve vakuu.

Svrchu uvedený produkt se zpracovává 2 hodiny při
teplotě místnosti působením 12 ml směsi fenolu, vody,
thioanisolu, 1,2-dithioethanu a kyseliny trifluoroctové v
poměru 0,75:0,5:0,5:0,25:10. Pak se zbylá pryskyřice
odfiltruje a na sintru je promyje malými podíly čisté
kyseliny trifluoroctové. Filtrát a promývací kapalina se
spojí, přidá se 100 ml diethyletheru a směs se zchladí.
Vysrážený produkt se izoluje odstředěním a etherový
supernatant se slije. Produkt se ještě 3krát promyje
diethyletherem podobným způsobem. Tímto způsobem se získá
238 mg surového produktu, který se suší ve vakuu. Podíl
119 mg tohoto materiálu se znovu rozpustí ve 2 ml 0,1%
vodného roztoku kyseliny trifluoroctové a roztok se
zfiltruje. Zfiltrovaný roztok se nanese na sloupec RP-
HPLC (Vydac 218TP1022, 22 x 250 mm). Sloupec se vymývá

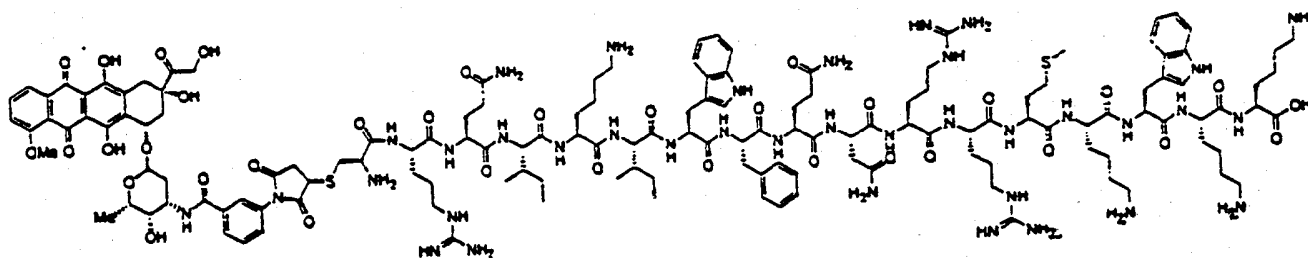
rychlostí 9 ml/min při použití gradientu 17,5 až 27,5 % MeCN v 0,1% vodném roztoku kyseliny trifluoroctové v průběhu 40 minut při teplotě 25 °C. Hlavní frakce se odebírají, sledují pomocí analytické RP-HPLC a spojí podle potřeby. Po odstředění ve vakuu se tímto způsobem získá 60,9 mg čistého produktu. Analytická RP-HPLC: $t_R = 15,8$ minut (Vydac 218TP54, gradient 17,5 až 27,5 % MeCN v 0,1% vodném roztoku kyseliny trifluoroctové, 20 minut, 1 ml/min, 25 °C, čistota vyšší než 99 %, $\lambda = 214$ nm), DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2351$, sumární vzorec $C_{107}H_{173}N_{35}O_{21}S_2 = 2349,87$.

N-[3-(maleimido)benzoyl]-doxorubicin

5,9 mg, 10 mikromol doxorubicinhydrochloridu (Aldrich, 86.036-0) se rozpustí v 1 ml vody a 0,5 ml DMF. Za míchání se přidá 0,5 ml 0,1 M vodného fosfátového pufru o pH 7,2. K výsledné suspenzi se přidá 12,9 mg, 40 mikromol N-hydroxysukcinimidesteru kyseliny 3-maleimidobenzoové po kapkách v 1 ml DMF. Červeně zbarvená reakční směs se postupně vyčeří a po přibližně 10 minutách je možno pozorovat tvorbu sraženiny. Průběh reakce se sleduje analytickou RP-HPLC, po 2 hodinách je reakce doxorubicinu úplná. Pak se směs zředí 1,5 ml vody, zchladí se na 4 °C a odstředí. Supernatant se slije. Výsledná usazenina se znovu rozpustí v 1 ml dimethylformamidu a zředí se 2 ml 0,1% vodného roztoku TFA. Tento roztok se nanese na předem naplněný sloupec v pevné fázi (500 mg LiChrolut RP-18 Merck, sloupec je předem uveden do rovnovážného stavu v MeOH s 0,1% vodným roztokem TFA). Sloupec se promývá 4 ml 0,1% vodného roztoku TFA a pak se provádí eluce směsí MeCN a vody v poměru 6:4, voda obsahuje 0,1% TFA, užijí se 2 frakce

promývací kapaliny, 2krát 4 ml. První frakce obsahuje výslednou látku a přímo se použije v následujícím stupni.

N-[3-[3-(H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)sukcinimido]benzoyl]doxorubicin



Svrchu získaný roztok N-[3-(maleimido)benzoyl]doxorubicinu se zředí 1 ml DMF a přidá se 50 mikrolitrů Et_3N . Barva roztoku se změní na tmavě hnědou. Pak se přidá H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v roztoku v 1 ml DMF. Směs se míchá, v průběhu míchání se hnědá barva změní na světle červenou. Reakce se sleduje analytickou RP-HPLC. Po 1,5 hodině je reakce 3-(maleimidobenzoyl)doxorubicinu ukončena. Roztok se okyselí 0,5 ml kyseliny octové, zředí se 3 ml vody a nanese se na předem naplněný extrakční sloupec v pevné fázi, užije se 500 mg prostředku LiChrolut RP-18 (Merck). Sloupec se promyje 6 ml 0,1% vodného roztoku TFA a pak se vymývá 6 ml směsí MeCN a vody s obsahem 0,1% TFA v poměru 6:4. Eluát se suší odstředěním ve vakuu. Zbytek se znovu

rozpustí ve 2 ml 0,1% vodného roztoku TFA, zfiltruje a čistí preparativní RP-HPLC (Vydac 218TP1022, 22 x 250 mm) při použití gradientu 20 až 40 % MeCN. Frakce s obsahem výsledné látky se oddělí, analyzují se analytickou RP-HPLC a podle potřeby spojí. Materiál se znovu odstředí ve vakuu, čímž se získá 1,2 mg čisté výsledné látky.

Analytická RP-HPLC: $t_R = 15,6$ a $15,8$ minut (částečně oddělené thioetherové diastereomery), gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %, $\lambda = 200$ až 300 nm, DE MALDI-TOF MS:

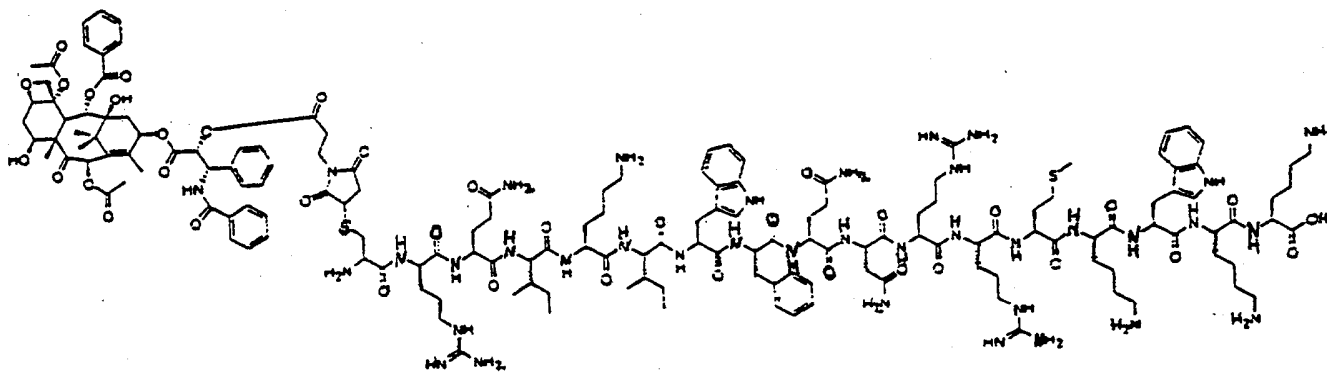
$[M + H]^+ = 3094$, $[M + 2H]^{2+} = 1548$, sumární vzorec $C_{145}H_{207}N_{37}O_{35}S_2 = 3092,56$.

Příklad 3a

2'-[(3-maleimidopropionoyl)]paclitaxel

5,7 mg, 0,034 mmol kyseliny 3-maleimidopropionové se rozpustí v 0,2 ml dichlormethanu. Směs se míchá a současně se přidává 2,4 mg, 0,019 mmol diisopropylkarböldiimidu v 0,5 ml bezvodého dichlormethanu. Reakce se nechá probíhat 30 minut za stálého míchání, pak se rozpouštědlo odpaří za sníženého tlaku. Odparek anhydridu kyseliny 3-maleimidopropionové se znovu rozpustí v 0,5 ml bezvodého pyridinu. Pak se přidá roztok 1 mg, 0,0012 mmol paclitaxelu (Aldrych 41,701-7) v 0,5 ml bezvodého pyridinu a směs se míchá 3 hodiny pod dusíkem. Pak se směs odpaří do sucha za sníženého tlaku. Odparek se zpracovává působením 1,5 ml vody. Po 10 minutách se směs extrahuje 3 x 5 ml dichlormethanu. Extrakty se spojí, promyjí se 3 x 1 ml vody, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří do sucha, čímž se získá výsledný produkt, jako bílý odparek.

2'-{3-[3-(Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-
-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH) sukcinimido]propionoyl}-
paclitaxel



Produkt z předchozí reakce se znovu rozpustí v 0,25 ml DMF a přidá se 2,5 mg, 0,0011 mmol H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v roztoku v 0,25 ml DMF spolu s přibližně 0,05 ml Et₃N. Směs se míchá pod dusíkem a průběh reakce se sleduje analytickou RP-HPLC. Po 45 minutách je reakce ukončena. Směs se zředí na 2 ml přidáním 0,1% vodného roztoku kyseliny trifluoroctové, zfiltruje se a nanese na sloupec RP-HPLC (Vydac 218TP1022, 22 x 250 mm). Sloupec se vymývá rychlostí 9 mm/min při použití gradientu 0 až 60 % MeCN v 0,1% vodném roztoku kyseliny trifluoroctové 40 minut při teplotě 25 °C. Hlavní frakce se analyzují pomocí RP-HPLC a podle potřeby se slijí. Po odstředění ve vakuu se tímto způsobem získá 1,2 mg čistého produktu. Analytická RP-HPLC: $t_R = 17,4$ a 17,5 minut (částečně rozdělené thioetherové diastereomery), (Vydac 218TP54, gradient 0 až 60 % MeCN v 0,1% vodném roztoku kyseliny trifluoroctové, 20 minut, 1 ml/min, 25 °C, čistota vyšší než 95 %, $\lambda = 200$ až 300 nm. DE MALDI-TOF MS: [M +

$H]^+ = 1679$, sumární vzorec $C_{161}H_{229}N_{37}O_{38}S_2 = 3354,90$.

Příklad 4a

Cytotoxická účinnost {[4[N-(2,4-diamino-6-
-pteridinylmethyl)-N-methylamino]benzoyl]-Glu-Gly-
-betaAla}₄-Lys₂-Lys-betaAla-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-
-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH

Tato látka, která bude v následujících tabulkách označována zkratkou „MTX-Pen“ byla vyhodnocena na svou schopnost vyvolat inhibici proliferace normálních (imortalizovaných) lidských buněk, šlo o buňky HaCaT v tabulkách 1 a 2, mimo to byly provedeny zkoušky s buněčnou linií lidského kolorektálního karcinomu HT29 v tabulce 3. Pro srovnání byl užit v tabulkách 1 až 3 volný methotrexát a v tabulce 1 volný vektor H-Ala-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH, tento vektor je v tabulce 1 označen zkratkou Pen.

Provedení zkoušky - Buňky byly naočkovány na plotny s 96 vyhloubeními v množství 2500 buněk/vyhloubení v prostředí DMEM s 10 % fetálního telecího séra a antibiotiky. Po inkubaci přes noc byly připraveny zkoumané látky v tomtéž prostředí v různém zředění a roztoky byly přidány k buňkám. Pak byly odebírány vzorky 1, 2, 3 a 4 dny po přidání roztoku. Pak bylo přidáno činidlo Nucleotide Releasing Reagent (LumiTech ViaLight) k rozrušení buněk a k uvolnění ATP. Po inkubaci 5 minut při teplotě místnosti byla směs přenesena na opakní plotny s 96 vyhloubeními a plotny byly uloženy až do analýzy při teplotě -20 °C. Pak byly plotny přeneseny do luminometru (Lucy 1, Labtech International) a do každého vyhloubení bylo přidáno

čínidlo ATP Monitoring Reagent (LumiTech ViaLight) v množství 20 mikrolitrů/vyhlobení a okamžitě byla měřena intenzita světla. Pro každý vzorek bylo provedeno 6 odečtení. Mimo to byly provedeny také příslušné kontroly. Bylo prokázáno, že bioluminiscence ATP byla přímoúměrná počtu životaschopných buněk v průběhu celé škály buněk ve všech vyhloubeních.

V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky, přičemž statisticky významné výsledky jsou vyznačeny silnějším tiskem.

Tabulka 1. Buňky HaCaT

Dávka (μM)	% uhynutí buněk											
	Den 1			Den 2			Den 3			Den 4		
	MTX	MTX-Pen	Pen	MTX	MTX-Pen	Pen	MTX	MTX-Pen	Pen	MTX	MTX-Pen	Pen
40.0	4	29	16	15	82	-22	79	97	5	92	98	12
13.3	22	-42	18	35	63	0	82	97	-17	92	98	-6
4.4	4	-8	8	24	45	-4	77	95	-1	93	98	10
1.5	13	-24	16	31	82	-31	77	82	2	94	88	-14
0.5	-4	-19	6	31	2	-6	75	29	-29	93	49	-26
0.2	7	14	26	11	21	0	79	20	-3	93	51	21

Tabulka 2. Buňky HaCaT

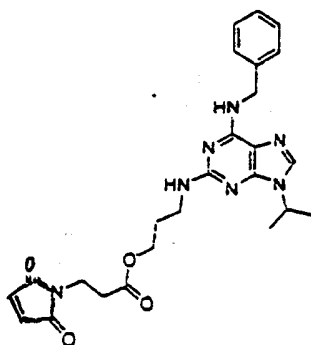
Dávka (μM)	% uhynutí buněk							
	Den 1		Den 2		Den 3		Den 4	
	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen
40.0		42		88		95		94
13.3		27		87		95		94
4.4	21	15	70	52	97	95	92	88
1.5	14	19	67	12	96	-16	91	17
0.5	0	13	59	24	96	-27	91	2
0.2	3		41		94		86	
0.1	19		7		45		65	

Tabulka 3. Buňky HF 29

Dávka (μM)	% uhynutí buněk							
	Den 1		Den 2		Den 3		Den 4	
	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen	MTX	MTX-Pen
40.0		31		79		96		98
13.3		3		45		88		96
4.4	-14	10	-4	6	58	46	86	77
1.5	17	16	-5	9	48	15	84	45
0.5	15	14	-12	8	52	17	88	16
0.2	10		-5		54		85	
0.1	6		-17		52		84	

Příklad 5a

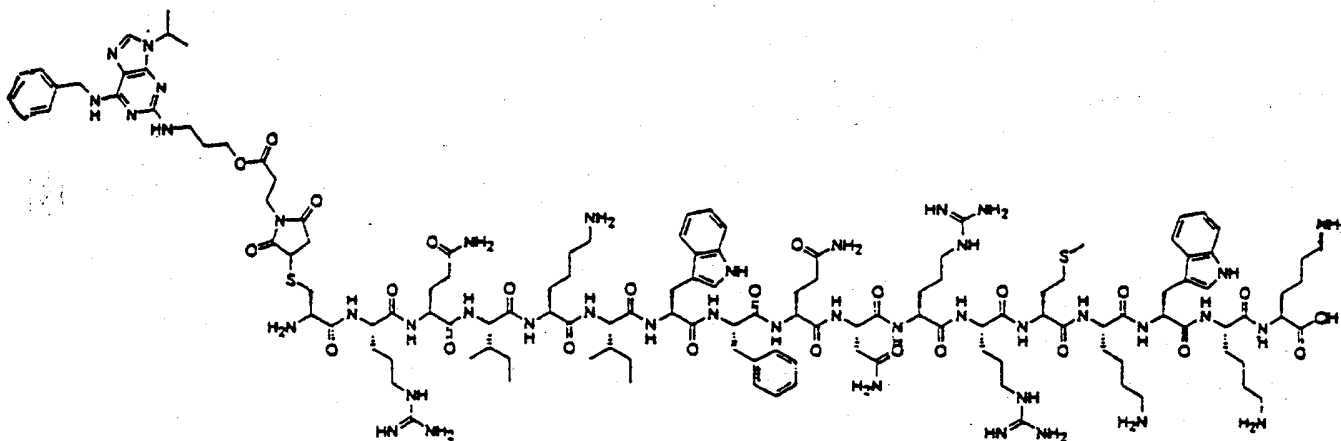
[(3-maleimidopropionoyl)]bohemín



12,8 mg, 76 mikromol kyseliny 3-maleimidopropionové se rozpustí v 1 ml methylenchloridu. Směs se míchá a přidává se 5,3 mg, 42 mikromol DIC v 0,5 ml methylenchloridu. Reakce se nechá probíhat za stálého míchání 40 minut. Pak se rozpouštědlo odpaří za sníženého tlaku. Odparek anhydridu kyseliny 3-maleimidopropionové se znovu rozpustí v 0,5 ml bezvodého pyridinu. Přidá se roztok 10,3 mg, 30 mikromol boheminu a 0,35 mg, 2 mikromol DMAP v 0,5 ml pyridinu a směs se ještě hodinu míchá pod dusíkem. Pak se směs odpaří do sucha za sníženého tlaku. Odparek se znovu rozpustí v 1 ml DMF a roztok se čistí preparativní RP-HPLC na sloupci (Vydac

218TP1022, 22 x 250 mm) při použití gradientu 10 až 60 % MeCN, čímž se ve výtěžku 88 % získá čistý produkt jako 14,7 mg bezbarvé pevné látky. Analytická RP-HPLC: $t_R = 17,7$ minut (sloupec Vydac 218TP54), gradient 0 až 60 % MeCN, čistota vyšší než 95 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) a DE MALDI-TOF MS byly v souladu s předpokládanou strukturou výsledné látky. Sumární vzorec $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_4 = 491,54$.

O(3-[3-(Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH)sukcinimido]propionoyl}bohemín



0,74 mg, 1,5 mmol produktu z předchozí reakce se rozpustí v 0,3 ml DMF a přidá se 50 ml Et_3N . Pak se přidá ještě 3,5 mg, 1,5 mmol H-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH v roztoku v 0,25 ml DMF. Směs se míchá pod dusíkem a průběh reakce se sleduje analytickou RP-HPLC. Po jedné hodině je reakce ukončena. Směs se zfiltruje a nanese se na sloupec RP-HPLC (Vydac 218TP1022, 22 x 250 mm). Sloupec se vymývá rychlostí 9 ml/min při použití gradientu 10 až 60 % MeCN v 0,1% vodné kyselině trifluoroctové v průběhu 40 minut při teplotě 25 °C. Hlavní frakce se sledují analytickou RP-HPLC a spojí podle potřeby. Po odstředění ve vakuu se ve výtěžku 40 % získá 1,7 mg čistého produktu. Analytická

RP-HPLC: $t_R = 15,0$ minut (Vydac 218TP54, gradient 0 až 60 % MeCN v 0,1% vodné kyselině trifluoroctové, 20 minut, 1 ml/min, teplota 25 °C, čistota vyšší než 95 %, $\lambda = 200$ až 300 nm). DE MALDI-TOF MS: $[M + H]^+ = 2842$, sumární vzorec $C_{132}H_{202}N_{42}O_{25}S_2 = 2841,42$.

Zastupuje:

SEQUENCE LISTING

<110> Cyclacel Limited
Fischer, M Peter
Wang, Shudong

<120> Podávací systém

<130> P004618WO NJN

<140> PCT/GB99/01957

<141> 1999-06-22

<150> GB 9814527.9

<151> 1998-07-03

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<400> 1

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

10

15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<400> 2

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<400> 3

Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<400> 4

Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

<400> 7

Arg Lys Met Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<400> 8

Arg Arg Glu Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<400> 9

Arg Arg Gln Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> Orn

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<400> 10

Arg Arg Xaa Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<400> 11

Arg Arg Met Lys Gln Lys Lys

1

5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<400> 12

Arg Arg Met Lys Trp Phe Lys

1

5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)

<223> Orn

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<400> 13

Arg Xaa Arg Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<400> 14

Arg Arg Met Trp Lys Lys Lys

1

5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<400> 15

Arg Arg Met Lys Lys Trp Lys

1

5

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> bAla

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

10

<400> 19

Lys Ala Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> bAla

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<400> 20

Ala Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys

1

5

10

15

Lys

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)

<223> Amidace

<400> 21

Cys Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Cys

1

5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<400> 22

Ala Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys

1

5

10

15

Lys

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)

<223> Amidace

<400> 23

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

Gly Cys Gly

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> bAla

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: syntetický peptid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Amidace

<400> 24

Ala Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)

<223> Amidace

<400> 25

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

10

15

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)

<223> Amidace

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<400> 26

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Uměle vytvořená sekvence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)

<223> Amidace

<220>

<223> Popis uměle vytvořené sekvence: synthetický peptid

<400> 27

Cys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys
1 5 10 15

Lys

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Podávací systém, tvořený účinnou látkou, vázanou na nosič, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nosič je tvořen homeoboxem peptidu nebo jeho fragmentem nebo derivátem a účinnou látkou je therapeuticky účinná nepeptidová a neoligonukleotidová účinná látka.
2. Podávací systém podle nároku 1, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že je účinný v neporušeném stavu.
3. Podávací systém podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že homeobox peptidu je odvozen od helixu 3 sekvence homeoboxu peptidu nebo jeho fragmentu nebo jeho derivátu.
4. Podávací systém podle nároku 3, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že homeobox peptidu je odvozen od peptidu *Prosophila antennapedia* nebo jeho fragmentu nebo derivátu.
5. Podávací systém podle nároku 3 nebo 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nosičem je penetratin nebo jeho fragment nebo derivát.
6. Podávací systém podle nároku 5, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že jako nosič obsahuje sekvenci SEQ ID No. 1.
7. Podávací systém podle nároku 5, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že jako nosič obsahuje zkrácenou sekvenci SEQ ID No. 1.

8. Podávací systém podle nároku 5 nebo 7,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako nosič
obsahuje sekvenci SEQ ID No. 2.
9. Podávací systém podle nároku 5 až 8,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že volná karboxylová
skupina na karboxyterminálním zakončení aminokyseliny
nosiče je převedená na karboxamidovou skupinu.
10. Podávací systém podle některého z nároků 3 až 9,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že homeobox peptidu
je tvořen D-aminokyselinami.
11. Podávací systém podle některého z nároků 1 až 10,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že účinná látka je
tvořena cytotoxickou látkou.
12. Podávací systém podle nároku 11,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se účinná látka
volí ze skupiny látek, poškozujících DNA nebo ze skupiny
antimetabolity, protinádorová antibiotika, přírodní
produkty a analogy těchto látek, inhibitory reduktázy
dihydrofolátu, pyrimidinové analogy, purinové analogy,
inhibitory kinázy, závislé na cyklinu, inhibitory
synthetázy thymidylátu, interkalátory DNA, látky, štěpící
DNA, inhibitory topoisomerázy, anthracykliny, látky z
čeledi Vinca, mitomyciny, bleomyciny, cytotoxické
nukleosidy, pteridinové látky, diyneny, podofyllotoxiny,
látky s obsahem platiny, látky, vyvolávající diferenciaci
a taxany.

13. Podávací systém podle nároku 12,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se účinná látka
volí ze skupiny methotrexat, methopterin,
dichlormethotrexát, 5-fluorouracil, 6-merkaptopurin,
trisubstituované puriny, jako olomoucín, roscovitin,
bohemín a purvalanol, flavopiridol, staurosporin,
cytosinarabínosid, melphalan, leurosin, actinomycin,
daunorubicín, doxorubicín, mitomycin D, mitomycin A,
carninomycin, aminopterin, tallysomycin, podofyllotoxin a
jeho deriváty, etoposid, cisplatina, carboplatina,
vinblastin, vincristin, vindesin, paclitaxel, docetaxel,
kyselina taxoterretinová, kyselina máselná,
acetylspermidin, tamoxifen, irinotecan a camptothecin.

14. Podávací systém podle nároku 13,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se účinná látka
volí ze skupiny methotrexat, podofyllotoxin a jeho
deriváty, etoposid, camptothecin, paclitaxel,
doxorubicín, roscovitin a bohemín.

15. Podávací systém podle některého z nároků 1 až 14,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že účinná látka je
přímo vázána na nosič.

16. Podávací systém podle některého z nároků 1 až 14,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že účinná látka je
na nosič vázána nepřímo prostřednictvím linkeru.

17. Podávací systém podle nároku 16,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se linker volí ze
skupiny (methylamino)benzoyl-Cys, sukcinimidobenzoyl-Cys,
sukcinimidopropionoyl-Cys, beta-alanyl-sukcinyl, acetyl-

-Cys a (4''-aminoanilin)-sukcinimidopropionoyl-Cys.

18. Podávací systém podle některého z nároků 1 až 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že 1 skupina nosiče váže více než jednu skupinu účinné látky.

19. Podávací systém podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že skupiny účinné látky jsou odlišné.

20. Podávací systém podle nároku 18 nebo 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že každá skupina účinné látky je na nosič vázána přes linker.

21. Podávací systém podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že každá skupina účinné látky je na nosič vázána stejnou skupinou linkeru.

22. Podávací systém podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že každá skupina účinné látky je na nosič vázána odlišnou skupinou linkeru.

23. Podávací systém podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že na nosič je vázána více než jedna skupina účinné látky sítí lysinových zbytků.

24. Podávací systém podle některého z nároků 20 až 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že na nosič je vázána více než 1 skupina účinné látky přes skupinu linkeru, která se volí ze skupiny (methyloamino)benzoyl-Cys, sukcinimidobenzoyl-Cys, sukcinimidopropionoyl-Cys,

beta-alanyl-sukcinyl, acetyl-Cys a (4''-aminoanilin)-sukcinimidopropionoyl-Cys.

25. Podávací systém podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako skupinu linkeru obsahuje sukcinimidopropionoyl-Cys.

26. Podávací systém podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že skupina nosiče je zkrácená forma penetratinu a linker dále zahrnuje 1 až 4 zbytky aminokyselin.

27. Podávací systém podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zbytky aminokyselin volí ze skupiny cysteinu, glycinu, kyseliny glutamové a beta-alaninu.

28. Podávací systém podle některého z nároků 1 až 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje skupinu pro zacílení systému.

29. Podávací systém podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že skupina pro zacílení je spojena s nosičem.

30. Podávací systém podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že skupina pro zacílení je spojena s účinnou látkou.

31. Makromolekula, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jde o podávací systém podle některého z nároků 1 až 30.

32. Makromolekula, vyznačující se tím, že je zvolena z následujících podávacích systémů:

#	Účinná látka	Linker	Nosič
	(methotrexát) ₄	((methylamino)benzoyl-EGβA) ₄	(L) ₃ βARQIKIWFQNRMMKWKK-OH
	doxorubicin	sukcinimidobenzoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH
	doxorubicin	sukcinimidobenzoyl-C	(D-K)(D-K)(D-W)(D-K)(D-M)(D-R)(D-R)(D-N)(D-Q)(D-F)(D-W)(D-I)(D-K)(D-I)(D-Q)(D-R-NH ₂)
	paclitaxel	2'-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH
N-term C-term	paclitaxel carboxyfluorescein	2'-sukcinimidopropionoyl-GCG βA	RQIKIWFQNRMMKWKK
	paclitaxel	2'-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-NH ₂
	paclitaxel	2'-sukcinimidopropionoyl-CβA	RRMMKWKK-NH ₂
	paclitaxel	7-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH
N-term C-term	podofyllotoxin biotinamidocaproyl	4-sukcinimidopropionoyl-GCG βA	RQIKIWFQNRMMKWKK
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-NH ₂
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	(D-R)(D-Q)(D-I)(D-K)(D-I)(D-W)(D-F)(D-Q)(D-N)(D-R)(D-R)(D-M)(D-K)(D-W)(D-K)(D-K-NH ₂)
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-CβA	RRMMKWKK-NH ₂
	podofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-CβA	(D-R)(D-R)(D-M)(D-K)(D-W)(D-K)(D-K-NH ₂)
	epipodofyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH
	epipodofyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-NH ₂
	epipodofyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-CβA	RRMMKWKK-NH ₂
	4'-demethyl epipodofyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH
	etoposid (G2, G3 a 4')	sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH
	roscovotin	sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH
	bohemin	βA-sukcinyl-βA	RQIKIWFQNRMMKWKK-OH

	bohemín	sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRRMKWKK-OH
	podo fyllotoxin	4-acetyl-C	RQIKIWFQNRRMKWKK-OH
	podo fyllotoxin	4-acetyl-C β A	RRMKWKK-NH ₂
	4'-demethyl epipodo fyllotoxin	4-acetyl-C β A	RRMKWKK-NH ₂
	4'-demethyl epipodo fyllotoxin	4-acetyl-C	RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂
	podo fyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-GC β A	RRMKWKK-NH ₂
	camptothecin	10-O-sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂
C-term	podo fyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	RRMKWKK
N-term	podo fyllotoxin	4-sukcinimidopropionoyl-C	
N-term	epipodo fyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-C	RRMKWKK
C-term	camptothecin	10-O-sukcinimidopropionoyl-C	
N-term	epipodo fyllotoxin	4'-sukcinimidopropionoyl-C	RRMKWKK
C-term	paclitaxel	2'-(sukcinimido)propionoyl-C	
	4'-methoxy-epipodo fyllotoxin	4-(4''-aminoanilino)sukcinimidopropionoyl-C	RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂
	4'-methoxy-epipodo fyllotoxin	4-(4''-aminoanilino)sukcinimidopropionoyl-C β A	RRMKWKK-NH ₂
	4'-demethyl-epipodo fyllotoxin	4-(4''-aminoanilino)sukcinimidopropionoyl-C β A	RRMKWKK-NH ₂

33. Podávací systém, tak jak je popsán v popisu a v příkladové části.

Zastupuje:

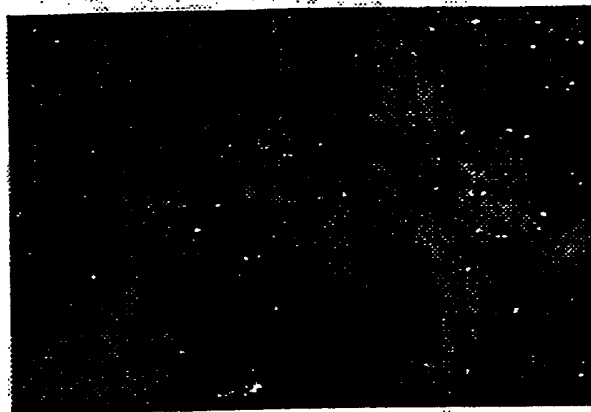
290301

PV 2001-32

1/3



A



B



C

FIG. 1

2/3

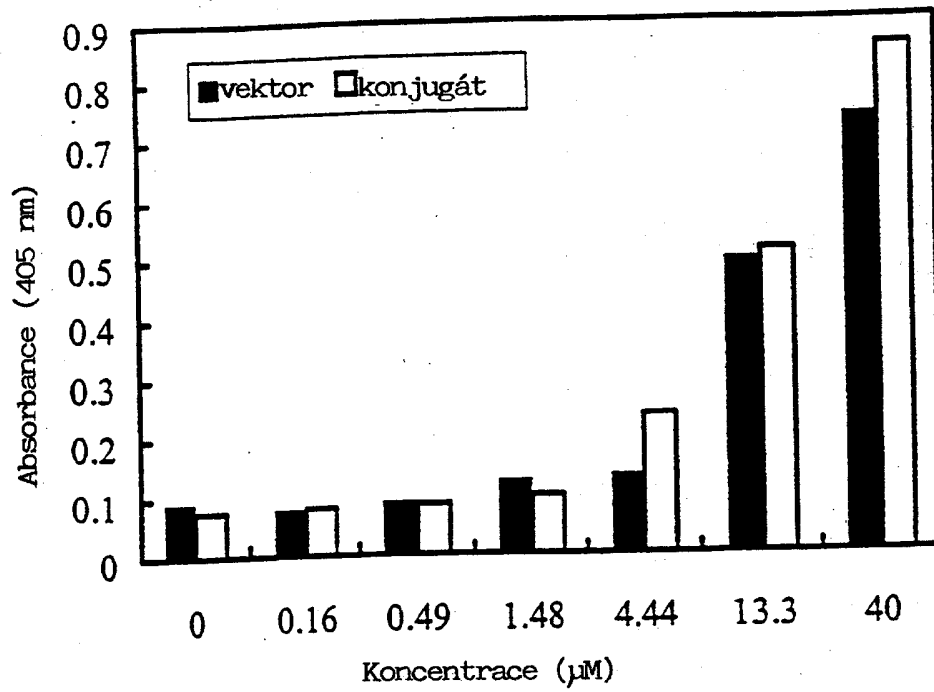


FIG. 2

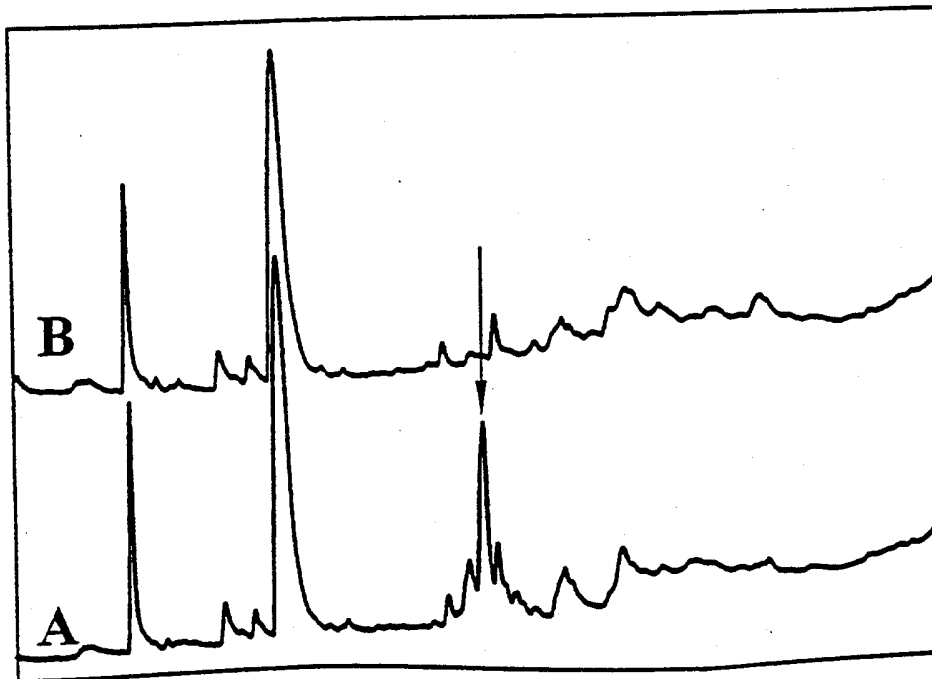


FIG. 4

29.03.01

71 2001-22

313



FIG. 3