

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 772

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 491/22 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-588**
(22) Přihlášeno: **26.09.2017**
(40) Zveřejněno: **24.04.2019**
(Věstník č. 17/2019)
(47) Uděleno: **13.03.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **24.04.2019**
(Věstník č. 17/2019)

(56) Relevantní dokumenty:
SHISHKANOVA, Tatiana V., a kol. Amino-substituted Tröger's base: electrochemical polymerization and characterization of the polymer film. Electrochimica Acta, 2017, 224, 439-445. ISSN: 0013-4686.
CN 101962536 B; WO 2017/062364 A2; CZ 2015-922 A3; CZ 2015-925 A3.

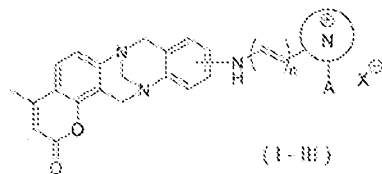
(73) Majitel patentu:
Univerzita Karlova, Praha 1, Staré Město, CZ

(72) Původce:
Ing. Martin Havlík, Ph.D., Praha 6, Řepy, CZ
Ing. Tomáš Bříza, Ph.D., Praha 4, Kunratice, CZ
Ing. Robert Kaplánek, Ph.D., Praha 10, Hostivař, CZ
RNDr. Jarmila Králová, CSc., Praha 2, Vinohrady, CZ
prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Praha 4, Chodov, CZ
prof. RNDr. Vladimír Král, DSc., Praha 2, Vinohrady, CZ

(74) Zástupce:
PATENT SKY s.r.o., Karlovarská 814/115, 161 00 Praha 6, Řepy

(54) Název vynálezu:
Kumarinový derivát Trögerovy báze s cyaninovou substitucí a jeho použití

(57) Anotace:
Předmětem vynálezu jsou kumarinové deriváty Trögerovy báze s cyaninovou substitucí obecného vzorce I až III, v enantiomerní či racemické formě. Tyto sloučeniny mohou být využity v oblasti selektivní intracelurární lokalizace lysozomů a mohou tak nalézt uplatnění v molekulární biologii.



CZ 307772 B6

Kumarinový derivát Trögerovy báze s cyaninovou substitucí a jeho použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká použití sloučenin založených na kumarinových derivátech Trögerovy báze s cyaninovou substitucí. Tyto sloučeniny mohou být využity v oblasti selektivní intracelulární lokalizace, konkrétně jako lysozomální próby.

10

Dosavadní stav techniky

Velká část vědeckých disciplín (anatomie, botanika, mikrobiologie, zoologie, biochemie, biofyzika, chemická a molekulární biologie atd.) se zaměřuje na studium životních pochodů na buněčné a sub buněčné úrovni. Tyto studie jsou obvykle prováděny s využitím specifických fluorescenčních sloučenin (prób), které se selektivně kumulují v cílových organelách buňky a slouží tak k získávání podrobných informací o vlastnostech, funkci a chování studovaných buněk a jejich organel. (Horobin RW, Rashid-Doubell F, Padiani JD, Milligan G.: Predicting small molecule fluorescent probe localization in living cells using QSAR modeling. 1. Overview and models for probes of structure, properties and function in single cells Biotech. Histochem. 2013, 88, 440-460; Hanson GT, Hanson BJ.: Fluorescent probes for cellular assays Comb Chem High Throughput Screen. 2014, 1, 60-83)

V této oblasti je většina vědeckého úsilí věnována především studiu vlastností a chování buněk, tkání a orgánů v závislosti na chování buněčného jádra nebo mitochondrií. Nicméně v poslední době se začíná ukazovat velký význam dalších organel, především lysozomů, na životní procesy a pochody v buňce. Lysozomy nejsou již vnímány jako jednoduché odpadní organely, ale začínají být studovány jako pokročilé komplexní systémy, které ovlivňují mnoho buněčných procesů, např. apoptózu. Lysozomální poruchy mohou vést k poškození nebo k ztrátě neuronů, což může ve výsledku znamenat mentální retardaci, progresivní degeneraci a předčasně úmrtí. Lysozomální dis-regulace byla také pozorována pro řadu vážných chorob, jako je Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, rakovina a kardiovaskulární, zánětlivé a metabolické onemocnění (Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, Öllinger K.: The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target J. Mol. Cell. Biol. 2013, 5, 214-226; Degtyarev M, De Maziere A, Klumperman J, Lin K: Autophagy, an achilles' heel AKTing against cancer? Autophagy 2009, 5, 415-418.; Ciechanover, A.: Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting Cell Death Differ. 2005, 12, 1178-1190; Ren J, Taegtmeier H.: Too much or not enough of a good thing - The Janus faces of autophagy in cardiac fuel and protein homeostasis J. Mol. Cell. Cardiol. 2015, 84, 223-226; Doupe, DP, Perrimon, N.: Visualizing and manipulating temporal signaling dynamics with fluorescence-based tools Sci Signal. 2014, 7, 1-16). Získání podrobných informací o vlastnostech a chování lysozomů za nejrůznějších fyziologických a patologických stavů patří mezi nutné podmínky pro vývoj diagnostických a terapeutických aplikací pro výše uvedené choroby. Tyto informace jsou nezbytné pro moderní biologii.

45

Obecně vzato jsou lysozomy obtížně pozorovatelné pomocí interferenčního kontrastu. Z tohoto důvodu je vyvíjena snaha nalézt vitální barviva pro specifické barvení lysozomů v živých buňkách. Drtivá většina současně používaných lysozomálních prób je založena na organických sloučeninách bazického charakteru, která obsahují fluorescenční jednotku. V neutrálním a slabě bazickém prostředí, které je typické pro krev a cytosol, jsou tyto látky bez náboje. Zatímco v kyselém, lysozomálním prostředí, jsou tyto látky protonovány a dochází tedy k jejich lysozomální akumulaci. (Mac Intyre AC, Cutler DJ.: The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases Biopharm Drug Dispos. 1988, 9, 513-526; Rashid F, Horobin RW, Williams MA.: Predicting the behaviour and selectivity of fluorescent probes for lysosomes and related structures by means of structure-activity models Histochem J. 1991, 23, 450-459).

55

Jedním z možných strukturních motivů použitelných pro přípravu lysozomálních prób představují bazické sloučeniny, které jsou nazývány Trögerovy báze. Fluorescenčních lysozomálních prób na základě Trögerovýchází bylo popsáno pouze několik, např. konjugáty s dimethylaminomethylem (Wua Z, Tang M, Tian T, Wua J, Denga Y, Dong X, Tanc Z, Wenga X, Liua, Z, Wanga C, Zhou X. A specific probe for two-photon fluorescence lysosomal imaging Talanta 2011, 87, 216-221).

Požadovanými vlastnostmi pro lysozomální próby jsou hlavně vysoká hodnota optického koeficientu, poloha absorpčních maxim ve viditelné oblasti, vysoká fluorescence a vysoká selektivita pro lysozomy. Aplikovatelnost Trögerovýchází v oblasti fluorescenčního značení lysozomů je závislá na kombinaci Trögerovy báze s vhodnou fluorescenční jednotkou.

Trögerovy báze s cyaninovou substitucí vykazují řadu vlastností, nezbytných pro konstrukci lysozomálních fluorescenčních prób. (Wua Z, Tang M, Tian T, Wua J, Denga Y, Dong X, Tanc Z, Wenga X, Liua, Z, Wanga C, Zhou X. A specific probe for two-photon fluorescence lysosomal imaging Talanta 2011, 87, 216-221; Bříza T, Rimpelová S, Králová J, Záruba K, Kejík Z, Ruml T, Martásek P, Král V.: Pentamethinium fluorescent probes: the impact of molecular structure on photophysical properties and subcellular localization Dyes Pigments. 2014, 107, 51-59; Rimpelová S, Bříza T, Králová J, Záruba K, Kejík Z, Císařová I, Martásek P, Ruml T, Král V.: Rational Design of Chemical Ligands for Selective Mitochondrial Targeting Bioconjugate Chem. 2013, 24, 1445-1454). Dosud však aplikace kumarinových derivátů Trögerovy báze s cyaninovou substitucí popsána nebyla.

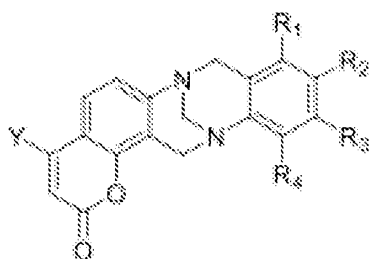
Podstata vynálezu

Předmětem tohoto patentu jsou kumarinové deriváty Trögerovýchází s cyaninovou substitucí a jejich aplikace jako lysozomálních fluorescenčních prób.

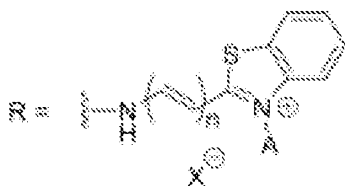
Připravili jsme optické systémy na základě Trögerovýchází, které jsou využitelné jako fluorescenční lysozomální próby. Jako funkční pro konstrukci optických systémů se ukázaly nové struktury sestávající z Trögerovy báze s cyaninovou substitucí, tzv. kumarinové deriváty Trögerovýchází s cyaninovou substitucí. Tyto látky se díky svému bazickému charakteru v lysozomech selektivně kumulují a díky vhodné fluorescenční jednotce je možná jejich snadná detekce. Navíc jsou tyto látky snadno připravitelné, kompatibilní s živými systémy, selektivní a mají požadované vlastnosti pro to, aby našly uplatnění ve fluorescenční mikroskopii pro biologické studie jako lysozomální próby.

Předmětem vynálezu jsou kumarinové deriváty Trögerovy báze s cyaninovou substitucí obecného vzorce I až III a jejich použití jako fluorescenčních lysozomálních prób. Tyto sloučeniny vykazují vysoce selektivní lysozomální lokalizaci a zároveň tyto sloučeniny vykazují vysokou absorpci a emisi a jejich absorpční maxima se nachází ve viditelné oblasti spektra.

Předmětem vynálezu jsou kumarinové deriváty Trögerovy báze:

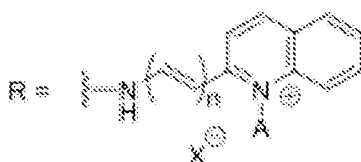


s cyaninovou substitucí obecného vzorce I,



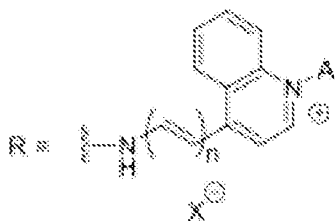
5 (I)

nebo s cyaninovou substitucí obecného vzorce II,



10 (II)

nebo s cyaninovou substitucí obecného vzorce III,



15 (III)

kde Y je H nebo alkyl C1 až C4;

R je cyaninový systém obecného vzorce I až III;

20 kde v případě, že R1 je R, tak R2, R3, R4 jsou H;

v případě, že R2 je R, tak R1, R3, R4 jsou H;

25 v případě, že R3 je R, tak R1, R2, R4 jsou H;

v případě, že R4 je R, tak R1, R2, R3 jsou H;

30 A je alkyl C1 až C12, nebo glykolové řetězce s počtem 1 až 8 glykolových (-OCH₂CH₂-) opakujících se jednotek končící O-alkyl substituentem C1 až C12 nebo -OH skupinou, nebo alkyl C1 až C8 sulfonové kyseliny nebo odpovídající jejich lithné nebo sodné, nebo draselné, nebo cesné, nebo rubidné soli, nebo allyl, nebo propargyl, nebo benzyl;

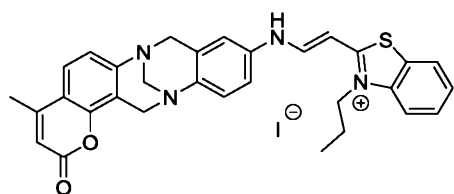
35 X je vybrána ze skupiny zahrnující: acetát, bromid, dihydrogenfosfát, fluorid, fosfát, hexafluorofosfát, hydrogensulfát, chlorid, chloristan, jodid, mesylát, monohydrogenfosfát, mravenčan, nitrát, nonafluorbutylsulfonát, sulfát, tetrafluoroborát, tosylát, triflát, trifluoracetát, trichloracetát, uhličitán;

40 n je 1 nebo 2;

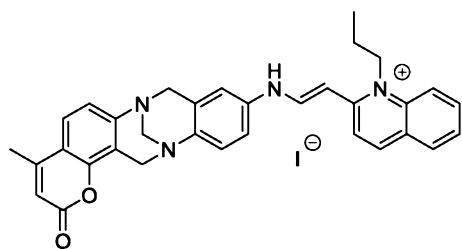
a soli kumarinových derivátů Trögerovýchází s cyaninovou substitucí s anorganickými nebo organickými kyselinami vybranými ze skupiny tvořené acetylacetáty, adipáty, askorbáty, benzoáty, besyláty, boritany, butanoáty, citráty, deoxycholáty, dihydrogenfosfáty, fenylacetáty, fosfáty, fumaráty, galát, glutaráty, hippuráty, hydrobromidy, hydrofluoridy, hydrogensulfáty, hydrochloridy, hydrojodidy, chloristany, choláty, isokyanát, isonikotináty, kapryláty, kyanatany, laktáty, lauráty, lithocholáty, maláty, maleáty, malonáty, mandeláty, mesyláty, monohydrogenfosfáty, mravenčany, myristáty, napsyláty, nikotináty, nitráty, octany, oleáty, oxaláty, oxopropanoáty, palmitáty, pikrát, pimeláty, propionáty, rhodanidy, salicyláty, sebakáty, skořicáty, stearáty, suberáty, sukcináty, sulfáty, tetrafluoroboráty, tosyláty, trifláty, trifluoracetáty, trichloracetáty, uhličitany, valeráty, vínany a sole přirozených aminokyselin;

v enantiomerní či racemické formě,

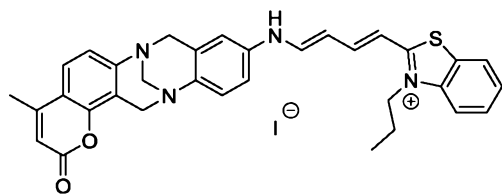
přičemž konkrétně byla připravena látka 1, spadající pod obecný vzorec I



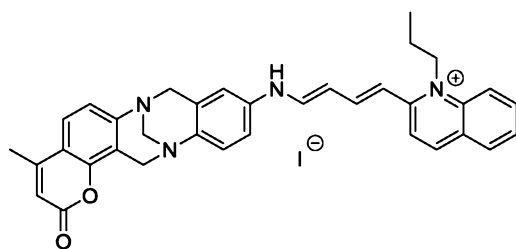
látka 2, spadající pod obecný vzorec II



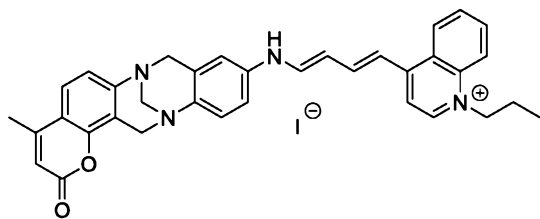
látka 3, spadající pod obecný vzorec III



látka 4, spadající pod obecný vzorec II



a látka 5, spadající pod obecný vzorec III



- Fluorescenční vlastnosti kumarinových derivátů Trögerovýchází s cyaninovou substitucí závisí zejména na počtu methiniových skupin. Pokud se jedná o Trögerovy báze s dimethiniovou substitucí ($n=1$), látky vykazují zelenou emisní fluorescenci, pokud má Trögerova báze tetramethiniovou substitucí ($n=2$) látky vykazují červenou emisní fluorescenci. Substituenty Y, A, X, R1, R2, R3 a R4 fluorescenční vlastnosti kumarinových derivátů Trögerovýchází s cyaninovou substitucí neovlivňují, což umožňuje značnou variabilitu těchto substituentů.
- Příprava kumarinových derivátů Trögerovy báze s cyaninovou substitucí a jejich aplikace jako lyzozomálních prób jsou doloženy následujícími příklady.

Objasnění výkresů

- Obr. 1 Strukturní vzorec kumarinového derivátu I Trögerovy báze s cyaninovou substitucí
- Obr. 2 Strukturní vzorec kumarinového derivátu II Trögerovy báze s cyaninovou substitucí
- Obr. 3 Strukturní vzorec kumarinového derivátu III Trögerovy báze s cyaninovou substitucí
- Obr. 4 Lokalizace látek 1-5 v lysozomech buněk odvozených od buněčných linií lidského karcinomu prsu 4T1. Panely mikroskopických snímků:
- 1) látka 1 v lysozomech buněk lidského karcinomu prsu 4T1 (zelená emise fluorescence způsobená přítomností dimethiniového řetězce Trögerovy báze),
 - 2) látka 2 v lysozomech buněk lidského karcinomu prsu 4T1 (zelená emise fluorescence),
 - 3) látka 3 v lysozomech buněk lidského karcinomu prsu 4T1 (červená emise fluorescence způsobená přítomností tetramethiniového řetězce Trögerovy báze),
 - 4) látka 4 v lysozomech buněk lidského karcinomu prsu 4T1 (červená emise fluorescence),
 - 5) látka 5 v lysozomech buněk 4T1 (červená emise fluorescence).
- Obr. 5 Složení Dulbeccem modifikovaného Eaglova média s obsahem glukózy.

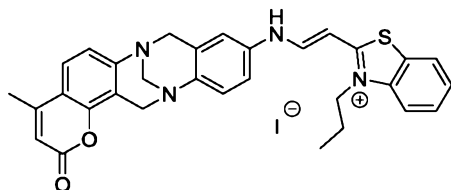
Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Příprava látky 1, spadající pod obecný vzorec I.

- 10-amino-8H-7,13-methanobenzo[b]chromeno[6,5-f][1,5]diazocin-3(14H)-on (64 mg; 0,20 mmol), (E)-2-(2-(N-fenylacetamido)vinyl)-3-propylbenzo[d]thiazol-3-ium jodid (116 mg; 0,25 mmol) a dimethylformamid (5 ml) byly zahřívány na 80 °C po dobu tří hodin a poté míchány přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla odpařena do sucha, bylo přidáno 5 ml acetonitrilu a směs byla sonifikována. Produkt byl separován filtrací, promyt 2 ml acetonitrilu, 5 ml etheru a za vakua vysušen. Bylo získáno 96 mg (74 %) produktu. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 11,33 (1H, br d, ca 8,5, NH), 8,46 (1H, br t, ca 9,3), 8,05 (1H, d, 8,0), 7,88 (1H, d,

8,3), 7,58 (1H, td, 7,9, 0,9), 7,54 (1H, d, 8,7), 7,46 (1H, t, 7,7), 7,26 (1H, d, 8,7), 7,19 (1H, dd, 8,7, 2,3), 7,18 (1H, d, 8,7), 7,06 (1H, d, 2,3), 6,21 (1H, d, 12,1), 6,21 (1H, q, 1,3), 4,71 (1H, d, 17,0), 4,62 (1H, d, 17,3), 4,30 (2H, překrytý), 4,28 (1H, překrytý, H12), 4,27 (1H, překrytý), 4,26 (1H, překrytý), 2,32 (3H, d, 1,3), 1,74 (2H, sex, 7,5), 0,95 (3H, t, 7,4). ¹³C APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): 168,53, 159,63, 153,53, 151,84, 150,69, 149,74, 144,99, 140,69, 134,71, 129,31, 128,16, 126,16, 125,94, 124,97, 123,63, 123,25, 120,73, 117,18, 115,54, 115,34, 114,80, 114,28, 112,12, 89,45, 65,70, 57,99, 53,90, 48,06, 20,65, 18,15, 10,9.

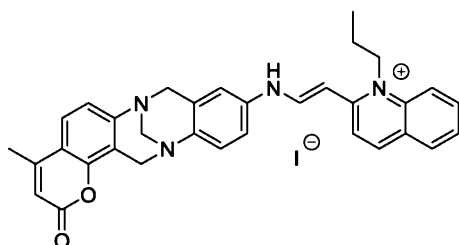


Struktura látky 1

Příklad 2

Příprava látky 2, spadající pod obecný vzorec II.

10-amino-8H-7,13-methanobenzo[b]chromeno[6,5-f][1,5]diazocin-3(14H)-on (64 mg; 0,20 mmol), (E)-2-(2-(N-fenylacetamido)vinyl)-1-propylchinol-1-ium jodid (115 mg; 0,25 mmol) a dimethylformamid (5 ml) byly zahřívány na 80 °C po dobu tří hodin a poté míchány přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla odpařena do sucha, bylo přidáno 5 ml acetonitrilu a směs byla sonifikována. Produkt byl separován filtrací, promyt 2 ml acetonitrilu, 5 ml etheru a za vakua vysušen. Bylo získáno 95 mg (74 %) produktu. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 11,14 (1H, d, 13,1, NH), 8,81 (1H, t, 12,5), 8,32 (1H, d, 9,6), 8,31 (1H, d, 9,6), 8,09 (1H, d, 8,9), 7,99 (1H, dd, 7,9, 1,6), 7,86 (1H, ddd, 8,9, 7,2, 1,6), 7,60 (1H, t, 7,5), 7,57 (1H, d, 8,6), 7,29 (1H, d, 8,7), 7,23 (1H, dd, 8,7, 2,4), 7,21 (1H, d, 8,6), 7,13 (1H, d, 2,4), 6,23 (1H, q, 1,2), 6,16 (1H, d, 12,0), 4,76 (1H, d, 17,1), 4,65 (1H, d, 17,3), 4,37 (2H, překrytý), 4,31 (1H, d, 17,3), 4,31 (2H, překrytý), 4,29 (1H, d, 17,1), 2,34 (3H, d, 1,2), 1,82 (4H, sex, 7,7), 1,13 (6H, t, 7,2). ¹³C APT NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): 159,63, 155,25, 153,51, 151,86, 150,69, 149,28, 144,48, 138,21, 138,17, 135,22, 133,04, 129,50, 129,26, 126,16, 126,05, 124,90, 123,6, 120,72, 118,88, 117,17, 116,72, 115,56, 114,79, 114,68, 112,12, 93,88, 65,71, 58,04, 53,88, 49,94, 20,27, 18,16, 10,77.



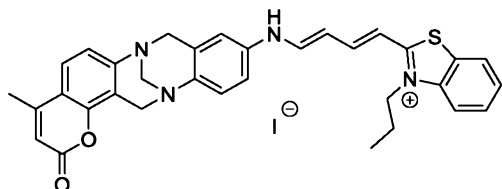
Struktura látky 2

Příklad 3

Příprava látky 3, spadající pod obecný vzorec I.

10-amino-8H-7,13-methanobenzo[b]chromeno[6,5-f][1,5]diazocin-3(14H)-on (64 mg; 0,20 mmol), 2-((1E,3E)-4-(N-fenylacetamido)buta-1,3-dien-1-yl)-3-propylbenzo[d]thiazol-3-ium jodid (123 mg; 0,25 mmol) a dimethylformamid (5 ml) byly zahřívány na 80 °C po dobu tří hodin a poté míchány přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla odpařena do sucha, bylo přidáno 5 ml acetonitrilu a směs byla sonifikována. Produkt byl separován filtrací, promyt 2

ml acetonitrilu, 5 ml etheru a za vakua vysušen. Bylo získáno 130 mg (96 %) produktu. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 11,12 (1H, br d, 13,5, NH), 8,39 (1H, br t, 12,2), 8,09 (1H, dd, 7,9, 1,3), 7,91 (1H, dd, 13,7, 12,0), 7,87 (1H, d, 8,3), 7,61 (1H, ddd, 8,3, 7,3, 1,3), 7,57 (1H, d, 8,6), 7,48 (1H, td, 7,6, 1,0), 7,28 (1H, d, 8,7), 7,20 (1H, d, 8,6), 7,10 (1H, dd, 8,7, 2,5), 6,93 (1H, d, 2,5), 6,77 (1H, d, 13,7), 6,23 (1H, q, 1,2), 6,19 (1H, t, 12,0), 4,74 (1H, d, 17,0), 4,65 (1H, d, 17,3), 4,39 (2H, br t, 7,4), 4,31 (1H, překrytý), 4,30 (1H, překrytý), 4,30 (1H, překrytý), 4,27 (1H, překrytý), 2,35 (1H, d, 1,2), 1,76 (2H, sex, 7,3), 0,97 (6H, t, 7,4). ^{13}C APT NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 167,65, 159,65, 154,31, 153,53, 151,83, 151,70, 150,70, 144,35, 141,18, 135,27, 129,36, 128,27, 126,28, 125,82, 125,46, 123,62, 123,39, 120,72, 116,24, 115,54, 114,81, 114,41, 114,36, 112,13, 107,37, 101,24, 65,72, 58,01, 53,88, 47,84, 21,04, 18,17, 10,78.

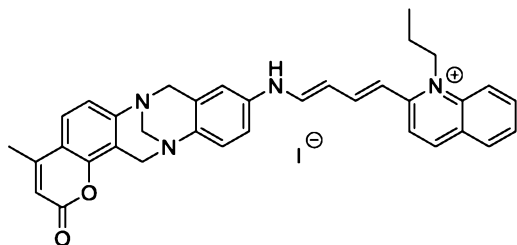


Struktura látky 3

Příklad 4

Příprava látky 4, spadající pod obecný vzorec II.

10-amino-8H-7,13-methanobenzo[b]chromeno[6,5-f][1,5]diazocin-3(14H)-on (64 mg; 0,20 mmol), 2-((1E,3E)-4-(N-fenylacetamido)buta-1,3-dien-1-yl)-1-propylchinolin-1-ium jodid (121 mg; 0,25 mmol) a dimethylformamid (5 ml) byly zahřívány na 80 °C po dobu tří hodin a poté míchány přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla odpařena do sucha, bylo přidáno 5 ml acetonitrilu a směs byla sonifikována. Produkt byl separován filtrací, promyt 2 ml acetonitrilu, 5 ml etheru a za vakua vysušen. Bylo získáno 89 mg (66 %) produktu. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 10,75 (1H, br d, 11,3, NH), 8,36 (1H, d, 9,5), 8,28 (1H, dd, 13,8, 11,9), 8,10 (1H, d, 8,9), 8,10 (1H, bs), 8,03 (1H, d, 9,5), 8,00 (1H, dd, 8,0, 1,6), 7,88 (1H, ddd, 8,9, 7,1, 1,6), 7,62 (1H, t, 7,6), 7,57 (1H, d, 8,7), 7,26 (1H, d, 8,7), 7,20 (1H, d, 8,7), 7,04 (1H, dd, 8,7, 2,6), 6,85 (1H, d, 2,6), 6,61 (1H, d, 13,8), 6,25 (1H, t, 11,9), 6,23 (1H, q, 1,2), 4,73 (1H, d, 17,1), 4,64 (1H, d, 17,1), 4,53 (2H, br t, 7,4), 4,31 (1H, d, ~12), 4,29 (1H, d, ~12), 4,29 (1H, d, 17,1), 4,28 (1H, d, 17,1), 2,35 (3H, d, 1,2), 1,80 (2H, sex, 7,7), 1,09 (3H, t, 7,4). ^{13}C APT NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 159,56, 154,26, 154,09, 153,43, 151,84, 150,67, 149,62, 143,77, 138,63, 138,30, 135,63, 133,26, 129,54, 129,28, 126,26, 126,21, 125,34, 123,51, 120,65, 118,91, 117,33, 115,97, 115,50, 114,73, 114,13, 112,05, 107,58, 106,74, 65,73, 57,98, 53,81, 49,37, 20,74, 18,07, 10,57.

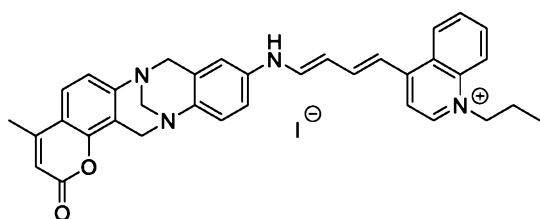


Struktura látky 4

Příklad 5

Příprava látky 5, spadající pod obecný vzorec III.

10-amino-8H-7,13-methanobenzo[b]chromeno[6,5-f][1,5]diazocin-3(14H)-on (64 mg; 0,20 mmol), 4-((1E,3E)-4-(N-fenylacetamido)buta-1,3-dien-1-yl)-1-propylchinol-1-ium jodid (121 mg; 0,25 mmol) a dimethylformamid (5 ml) byly zahřívány na 80 °C po dobu tří hodin a poté míchány přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla odpařena do sucha, bylo
 5 přidáno 5 ml acetonitrilu a směs byla sonifikována. Produkt byl separován filtrací, promyt 2 ml acetonitrilu, 5 ml etheru a za vakua vysušen. Bylo získáno 81 mg (61 %) produktu. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 10,54 (1H, br d, 10,7, NH), 8,67 (1H, d, 7,1), 8,61 (1H, d, 8,6), 8,19 (1H, d, 8,6), 8,16 (1H, dd, 14,1, 12,0), 8,01 (1H, t, 7,9), 8,00 (1H, bs), 7,75 (1H, t, 7,9), 7,70 (1H, d, 7,1), 7,57 (1H, d, 8,6), 7,23 (1H, d, 8,76), 7,20 (1H, d, 8,6), 7,16 (1H, d, 14,1), 7,01 (1H, dd, 8,7, 2,5),
 10 6,81 (1H, d, 2,5), 6,23 (1H, q, ~1), 6,20 (1H, t, 12,0), 4,72 (1H, d, 16,9), 4,63 (1H, d, ~17), 4,59 (2H, br t, 7,4), 4,31 (1H, d, ~12), 4,28 (1H, d, ~12), 4,28 (1H, d, ~17), 4,26 (1H, d, ~17), 2,35 (3H, d, ~1), 1,87 (2H, sex, 7,3), 0,94 (3H, t, 7,3). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): 159,64, 153,51, 152,38, 151,93, 150,70, 149,84, 147,45, 143,82, 143,20, 137,85, 136,09, 133,89, 129,24, 127,16, 126,22, 125,87, 124,60, 123,55, 120,71, 118,24, 115,57, 114,76, 113,54, 112,09, 110,20,
 15 110,02, 107,63, 65,79, 58,05, 55,90, 53,84, 22,34, 18,15, 10,68.



Struktura látky 5

20

Příklad 6

Selektivní lokalizace látek 1 až 5 v lysozomech.

25 Experimentální data znázorňující selektivní lysozomální lokalizaci látek 1 až 5 připravených v příkladech 1 až 5.

Buňky odvozené od buněčné linie 4T1 byly kultivovány v DMEM médiu (Dulbeccem modifikované Eaglovo médium s vysokým obsahem glukózy - složení viz obrázky 5, Sigma USA) doplněném o 10% fetální bovinní sérum (FBS, Thermo Scientific, USA). Buňky byly
 30 udržovány v logaritmické fázi růstu a kultivovány za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO₂, 95 % vlhkosti). Pro mikroskopické experimenty byly buňky inokulovány na kultivační misky se skleněným dnem (průměr 35 mm). Buňky byly inkubovány za standardních podmínek po dobu 16 h.

35

Připravené 4T1 buňky byly dvakrát omyty předeřhřátým (37 °C) fosfátovým pufrům (PBS; pH 7,4) a inkubovány v kompletním kultivačním médiu s látkami 1 nebo 2 (po dobu 15 minut) nebo s látkami 3, 4 nebo 5 (po dobu 20 minut). Látky 1 až 5 byly použity ve formě zásobního roztoku o koncentraci 20 nM.

40

Buňky po inkubaci s látkami 1, 2, 3, 4 nebo 5 byly omyty fosfátovým pufrům a pozorovány pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Cell[^]R (Olympus, Japonsko) za použití 60x (numerická apertura 1,4), a 100x imersního objektivu (Olympus, Japonsko). Lokalizace látek 1 až 5 v živých buňkách odvozených z buněčné linie 4T1 byla studována v reálném čase. Snímky
 45 z mikroskopu jsou zobrazeny na obrázku 4. Snímky z fluorescenčního mikroskopu ukazují lokalizaci látek 1 až 5 v lysozomech buněk odvozených z buněčné linie 4T1. Snímky dokládají zelenou fluorescenci lysozomů po použití látek 1 nebo 2. Zelená emisní fluorescence je způsobena dimethiniovým řetězcem Trögerovy báze (n=1). Po použití látek 3, 4 nebo 5 vykazují

lysozomy červenou emisní fluorescenci díky přítomnosti tetramethiniového řetězce Trögerovy báze (n=2).

5 Průmyslová využitelnost

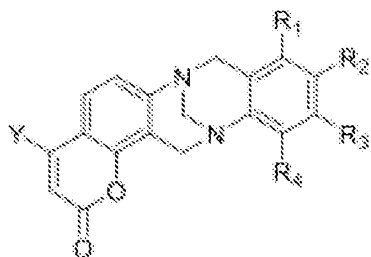
Kumarinové deriváty Trögerovy báze s cyaninovou substitucí jsou využitelné k přípravě lysozomálních sond a mohou tak nalézt uplatnění v molekulární biologii.

10

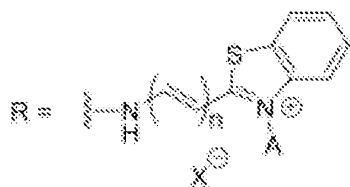
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kumarinový derivát Trögerovy báze

15



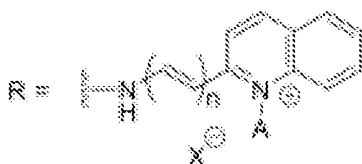
s cyaninovou substitucí obecného vzorce I,



20

(I)

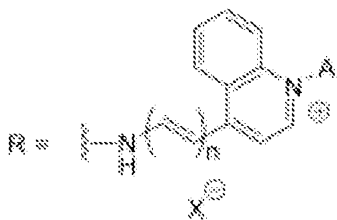
nebo s cyaninovou substitucí obecného vzorce II,



25

(II)

nebo s cyaninovou substitucí obecného vzorce III,



30

(III),

kde Y je H nebo alkyl C1 až C4;

R je cyaninový systém obecného vzorce I až III;

kde v případě, že R1 je R, tak R2, R3, R4 jsou H;

5 v případě, že R2 je R, tak R1, R3, R4 jsou H;

v případě, že R3 je R, tak R1, R2, R4 jsou H;

10 v případě, že R4 je R, tak R1, R2, R3 jsou H;

A je alkyl C1 až C12 nebo glykolové řetězce s počtem 1 až 8 glykolových, -OCH₂CH₂-, opakujících se jednotek končící O-alkyl substituentem C1 až C12 nebo -OH skupinou nebo alkyl C1 až C8 sulfonové kyseliny nebo odpovídající jejich lithné nebo sodné, nebo draselné, nebo cesné, nebo rubidné soli nebo allyl nebo propargyl nebo benzyl;

15 X je vybrána ze skupiny zahrnující: acetát, bromid, dihydrogenfosfát, fluorid, fosfát, hexafluorofosfát, hydrogensulfát, chlorid, chloristan, jodid, mesylát, monohydrogenfosfát, mravenčan, nitrát, nonafluorbutylsulfonát, sulfát, tetrafluoroborát, tosylát, triflát, trifluoracetát, trichloracetát, uhličitán;

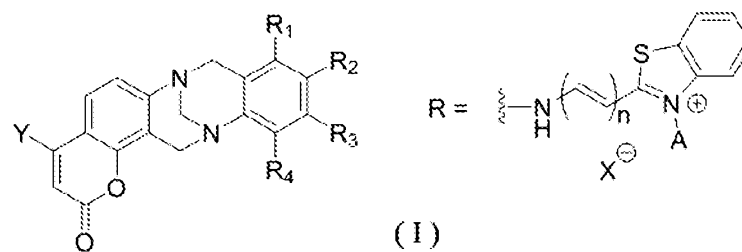
20 n je 1 nebo 2;

a soli kumarinových derivátů Trögerovýchází s cyaninovou substitucí s anorganickými nebo organickými kyselinami vybranými ze skupiny tvořené acetylacetáty, adipáty, askorbáty, benzoáty, besyláty, boritany, butanoáty, citráty, deoxycholáty, dihydrogenfosfáty, fenylacetáty, fosfáty, fumaráty, galát, glutaráty, hippuráty, hydrobromidy, hydrofluoridy, hydrogensulfáty, hydrochloridy, hydrojodidy, chloristany, choláty, isokyanát, isonikotináty, kapryláty, kyanatany, laktáty, lauráty, lithocholáty, maláty, maleáty, malonáty, mandeláty, mesyláty, monohydrogenfosfáty, mravenčany, myristáty, napsyláty, nikotináty, nitráty, octany, oleáty, oxaláty, oxopropanoáty, palmitáty, pikrát, pimeláty, propionáty, rhodanidy, salicyláty, sebakáty, skořicáty, stearáty, suberáty, sukcináty, sulfáty, tetrafluoroboráty, tosyláty, trifláty, trifluoracetáty, trichloracetáty, uhličitany, valeráty, vínany a sole přirozených aminokyselin;

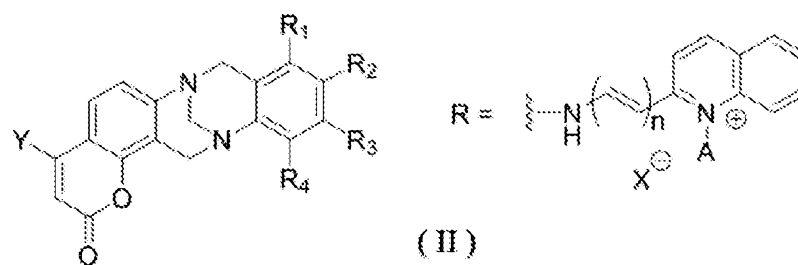
35 v enantiomerní či racemické formě.

2. Použití kumarinového derivátu Trögerovy báze s cyaninovou substitucí obecného vzorce I až III podle nároku 1 pro přípravu fluorescenční próby pro selektivní intracelulární lokalizaci lysozomů.

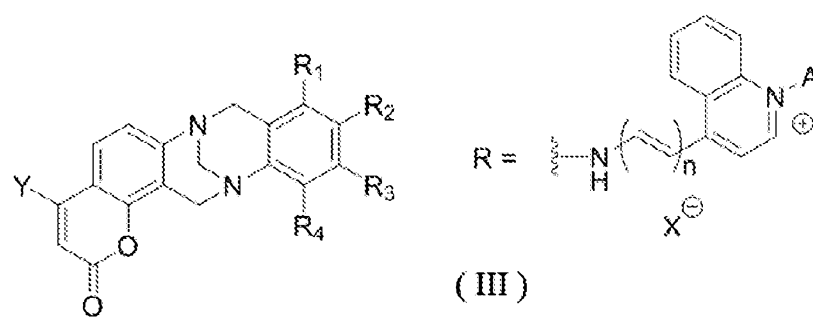
3 výkresy



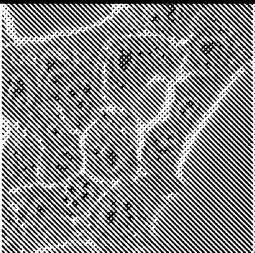
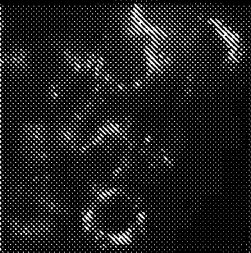
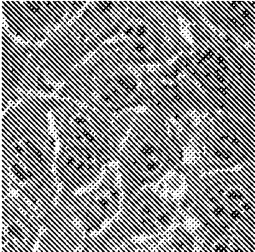
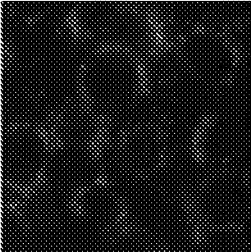
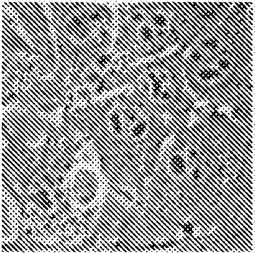
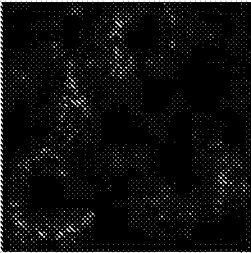
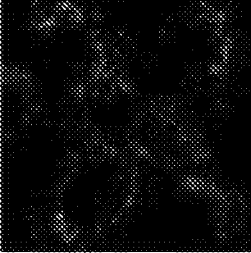
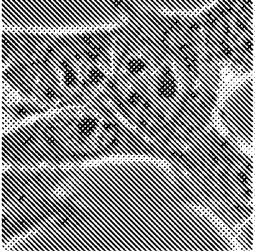
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Látka	Fázový kontrast	Fluorescence
1		
2		
3		
4		
5		

Obr. 4

SLOŽENÍ	g/l
Anorganické soli	
CaCl ₂	0,2
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0,0001
MgSO ₄	0,09767
KCL	0,4
NaHCO ₃	3,7
NaCl	6,4
NaHPO ₄	0,109
Aminokyseliny	
L-alanyl-L-glutamin	-
L-arginin • HCl	0,084
L-cystin • 2HCl	0,0626
L-glutamin	0,584
Glycin	0,03
L-histidin • HCl • H ₂ O	0,042
L-isoleucin	0,105
L-leucin	0,105
L-lysin HCl	0,146
L-metionin	0,03
L-fenylalanin	0,066
L-serin	0,042
L-treonin	0,095
L-tryptofan	0,016
L-tyrosin • 2Na • 2H ₂ O	0,10379
L-valin	0,094
Vitamíny	
Chlorid cholinu	0,004
Kyselina listová	0,004
Myo-inositol	0,0072
Niacin	0,004
D-pantotenová	0,004
Pyridoxal • HCl	-
Pyridoxin • HCl	0,00404
Riboflavin	0,0004
Thiamin • HCl	0,004
Ostatní	
D-glukóza	4,5
HEPES	-
Fenolová červeň • Na	0,0159
Pyruvát • Na	-
Přídavek	
Glukóza	-
L-glutamin	-
NaHCO ₃	-

Obr. 5