

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2018-331
(22) Přihlášeno: 04.07.2018
(40) Zveřejněno: 15.01.2020
(Věstník č. 3/2020)
(47) Uděleno: 15.07.2020
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 26.08.2020
(Věstník č. 35/2020)

C07F 15/06 (2006.01)
C07C 279/00 (2006.01)
C07C 251/74 (2006.01)
C07C 39/08 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)
C07H 19/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WENDER P. A. et al.: „Guanidinium-rich, glycerol-derived oligocarbonates: A new class of cell-penetrating molecular transporters that complex, deliver, and release siRNA,“ Molecular Pharmaceutics, vol. 12, no. 3, 2015, str. 742 - 750, ISSN 1543-8384; HONG H. et al.: „Polyion complex micelles composed of pegylated polyasparthydrazide derivatives for siRNA delivery to the brain,“ Journal of Colloid and Interface Science, vol. 447, 2015, str. 8 - 15, ISSN 0021-9797.
CZ 306 254; WO 2006115312; US 2007009889; CZ 304 112; CZ 305 607.

(73) Majitel patentu:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, Dejvice, CZ

(72) Původce:
Mgr. Liudmila Vasina, Praha 4, CZ
Ing. Robert Kaplánek, Ph.D., Praha 10, CZ
prof. RNDr. Vladimír Král, DSc., Praha 2,
Vinohrady, CZ

(54) Název vynálezu:
Transportéry nukleotidových struktur na bázi hydrazonů jako terapeutický nástroj pro cílení léku pro nádorovou imunoterapii

(57) Anotace:
Vynález se týká nového transportního komplexu RNA na bázi hydrazonů použitelný především jako transportní systém řetězců či fragmentů DNA/RNA přes modelové biologické membrány (PAMPA- paralelní analýza permeability umělou membránou). Připravené komplexy transportér-RNA mohou být použity jako terapeutický nástroj pro cílení léku pro nádorovou imunoterapii.

Transportéry nukleotidových struktur na bázi hydrazonů jako terapeutický nástroj pro cílení léku pro nádorovou imunoterapii

5 Oblast techniky

Předmětem vynálezu je příprava komplexů transportér-RNA na bázi hydrazonů použitelných především jako terapeutický nástroj pro cílení léku pro nádorovou imunoterapii. Zjištění jejich chemicko-fyzikálních vlastností (termodynamické parametry či struktura) pro tvorbu komplexu transportér-RNA, s využitím zejména spektroskopických metod a PAMPA (paralelní analýza permeability umělou membránou) dovolilo identifikaci účinných transportérů. Dopravní účinnost a cytotoxicita nových nosičů byla otestována na primárních leukemických buňkách (PLC).

15 Dosavadní stav techniky

Rakovina je jedním z hlavních cílů terapie primárně založené na RNAi, protože onkogeny, mutované geny potlačující nádory a mnoho různých genů, které přispívají k rozvoji nádoru, jsou potenciálně důležité pro tlumení genů pomocí RNAi. V současné době se siRNA používá jak pro základní výzkum, tak pro terapii různých onemocnění včetně rakoviny. Dodávání nukleokyselinových terapeutik (DNA, siRNA či oligonukleotidy) pro down-regulaci mutovaných genů a na potlačení nechtěné exprese genů se stává zajímavou metodou pro potlačení rakovinného bujení a jeho invazivnosti. Optimální kombinace výrazných protirakovinných siRNA a účinných systémů pro jejich transport do buněk mohou být vhodnou cestou pro úspěšnou klinickou aplikaci siRNA [A. Singh, P. Trivedi, N. K. Jain: Advances in siRNA delivery in cancer therapy. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 46 (2018) 274-283].

siRNA jsou dvojřetězcové molekuly RNA o délce 20 až 25 párů bází, o nichž je známo, že způsobují degradaci dokonalé komplementární cílové RNA. siRNA mohou vznikat z RNA transkribované v jádru (endogenní siRNA), nebo mohou být zavedeny virálně nebo jako chemicky syntetizované dsRNA (exogenní siRNA). Aby mohla siRNA vykonávat svoji funkci, musí být odpojena a zachycena do ribonukleoproteinu RISC (z angl. RNA-induced silencing complex). Komplex RISC obsahuje argonaut-proteiny (AGO), které vykazují endonukleolytickou aktivitu zodpovědnou za štěpení cílové RNA. Jeden z obou vláken duplexu siRNA (vedoucí vlákno) je zachyceno v komplexu RISC, zatímco druhé vlákno (vedlejší vlákno) je uvolněno a degradováno [F. Micheli, A. P. Jali, S. Francia, C. Meers, Z. T. Neeb, F. Rossiello, U. Gioia, J. Aguado, C. Jones-Weinert, B. Luke, G. Biamonti, M. Nowacki, F. Storici, P. Carninci, N. G. Walter, F. d'Adda di Fagagna: From "Cellular" RNA to "Smart" RNA: Multiple Roles of RNA in Genome Stability and Beyond. Chem. Rev. 118 (2018) 4365-4403].

Vlastnosti volné siRNA, která je typem dvouvláknové malé RNA, zejména její hydrofilnost a záporný náboj, brání jejímu snadnému překročení biologických membrán [K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson: Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nat. Rev. Drug Discov. 8 (2009) 129-138]. Další výzvou pro terapii siRNA je tzv. imunitní stimulace, což je rozpoznávání duplexu siRNA vrozeným imunitním systémem. Zavedení příliš velkého množství siRNA vede k aktivaci vrozených imunitních odpovědí. [J. T. Marques, B. R. Williams: Activation of the mammalian immune system by siRNAs. Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1399-1405]. K překonání těchto potíží je nezbytný vývoj bezpečného a efektivního systému pro podání *in vivo*. Účinnost léčiv na bázi siRNA v boji s rakovinou vyžaduje výrazné a účinné tlumení genů v nádorových buňkách. Pro dosažení efektivního dodávání siRNA by měl ideální transportní systém siRNA vykazovat následující charakteristiky: (1) být biokompatibilní, biologicky odbouratelný a neimunogenní, (2) musí chránit siRNA před sérovými nukleázami během průchodu cirkulací a během uvolňování do endosomů, (3) vyhnout se rychlému jaternímu nebo renálnímu vyloučení a (4) zprostředkovávat dodávání siRNA do cílových buněk při zachování normálních tkání. Návrh vhodného *in vivo* systému pro dodávání siRNA by měly zahrnovat

metody pro zvýšení sérového poločasu siRNA, jeho distribuci do cílové tkáně, její buněčné vychytávání s následným intracytoplazmatickým uvolňováním bez degradace.

5 Současně vyvinuté systémy pro transport, resp. pro cílené dodávání siRNA pro léčbu rakoviny zahrnují zejména: (1) chemicky modifikované siRNA, (2) lipidové systémy pro transport siRNA, (3) polymerní systémy transport siRNA, (4) systémy s konjugáty siRNA, (5) – kombinace transportu siRNA spolu s protinádorovými léčivy a (6) použití anorganických nanočástic.

10 Tyto modifikace pomáhají řešit problémy nahé siRNA související s: (1) sérovou stabilitou, (2) vylučováním látek s větší molekulovou hmotností, (3) vysokou toxicitou (cytotoxicitou), (4) interakcemi ligand-receptor, (5) dosažení rakovinných tkání a (6) renální vylučování. Všechny tyto výhody je obtížné získat během jediné modifikace. Pro protinádorové siRNA, které mají svou aktivitu v rakovinových tkáních, byly použity chemické modifikace nahé siRNA pro tvorbu siRNA, která je rezistentní vůči nukleáze, aby se zabránilo degradaci, zvýšila se stabilita siRNA a
15 zlepšila se doba cirkulace i absorpce v nádoru *in vivo*. [A. Singh, P. Trivedi, N. K. Jain: Advances in siRNA delivery in cancer therapy. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 46 (2018) 274-283].

20 Různé strategie dodávání, které se dnes používají, se pohybují od metod variabilního dávkování, jako je endocytóza vezikulárních buněk (např. transfekce na bázi lipidů) nebo dodávání membránovou permeabilizací (např. elektroporace, permeabilizace detergenty a bakteriálními toxiny tvořícími póry) [F. Michelini, A. P. Jaliha, S. Francia, C. Meers, Z. T. Neeb, F. Rossiello, U. Gioia, J. Aguado, C. Jones-Weinert, B. Luke, G. Biamonti, M. Nowacki, F. Storici, P. Carninci, N. G. Walter, F. d'Adda di Fagagna: From "Cellular" RNA to "Smart" RNA: Multiple
25 Roles of RNA in Genome Stability and Beyond. Chem. Rev. 118 (2018) 4365-4403].

Pro cílenou distribuci léku, jehož vlastnosti neumožňují jeho přímé použití, je třeba vyvinout spolehlivé transportní systémy. Schopnost léčiva nebo sondy přestoupit biologické bariéry (membrány) byla historicky považována za funkci jeho fyzikálních vlastností. Polymerní makromolekuly představují univerzální platformu pro přípravu nosičů nukleových kyselin, které
30 vytvoří interpolyelektronické komplexy se záporně nabitou RNA v důsledku elektrostatických interakcí, které jsou obecně použity pro transfekci v buněčných kulturách. Molekulární transportní systémy představují novou strategii, jak při pomoci polymerních nosičů obejít omezení. Jako molekulární transportéry lze použít látky s nábojem a/nebo se specifickými
35 skupinami, umožňujícími reverzibilní zachycení léčiva. Hydrazony mohou z principu díky svým vlastnostem být takovými vhodnými látkami, resp. transportéry.

Hydrazony vykazují širokou škálu biologické aktivity, zejména antimikrobiální, protizánětlivou, analgetickou, antimalarickou, protirakovinnou, antituberkulární či antivirovou [G. Verma, A.
40 Marella, M. Shaquiquzzaman, M. Akhtar, M. R. Ali, M. M. Alam: A review exploring biological activities of hydrazones. J. Pharm Bioallied Sci. 6 (2014) 69-80; R. Kaplánek, M. Havlík, B. Dolenský, J. Rak, P. Džubák, P. Konečný, M. Hajdúch, J. Králová, V. Král: Synthesis and biological activity evaluation of hydrazone derivatives based on a Tröger's base skeleton. Bioorg. Med. Chem. 23 (2015) 1651-1659; S. Rollas, S. G. Kucukguzel: Biological activities of
45 hydrazone derivatives. Molecules. 12 (2007) 1910-1939; P. Kumar, B. Narasimhan: Hydrazides/Hydrazones as Antimicrobial and Anticancer Agents in the New Millennium. Mini-Rev. Med. Chem. 13 (2013) 971-987; M. Bijo, S. Jerad, J. A. Mohamed, E. M. Githa, U. Dhasthakeer, N. S. S. Puthucode, F. S. Kallivalappil, M. Srinubabu: Hydrazones as a Privileged Structural Linker in Antitubercular Agents: A Review. Infectious Disorders - Drug Targets. 15
50 (2015) 76-88]. Hydrazony tak představují důležitou skupinu sloučenin vhodných pro vývoj nových léčiv. Tyto sloučeniny obsahují vazbu $-C=NNH-$, která je konjugována s volným elektronovým párem funkčního dusíku. Kombinace hydrazonů s jinou funkční skupinou (např. s dalším farmakoforem), vede k sloučeninám s jedinečnými biologickými, fyzikálními a chemickými vlastnostmi.

55

Naše předchozí výsledky ukázaly, že chelátory na bázi hydrazonů vykazují mnohdy výraznou cytotoxickou aktivitu a selektivitu vůči rakovinným buňkám [J. Rak, R. Kaplánek, V. Král, J. Králová, T. Štulcová, P. Drašar: Konjugáty hydrazonů s kyselinou cholovou jako nová cytostatika. Patent CZ304112 B6 (2013); J. Rak, R. Kaplánek, T. Štulcová, P. Drašar, M. Havlík, T. Bříza, P. Džubák, M. Hajdúch, P. Konečný, J. Štěpánková, J. Králová, V. Král: Cholylyhydrazony a jejich použití k léčbě nádorových onemocnění a leukémií, Patent CZ305607 B6 (2016); R. Kaplánek, M. Havlík, B. Dolenský, J. Rak, P. Džubák, P. Konečný, M. Hajdúch, J. Králová, V. Král: Synthesis and biological activity evaluation of hydrazone derivatives based on a Tröger's base skeleton. *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 1651-1659; R. Kaplánek, M. Jakubek, J. Rak, Z. Kejík, M. Havlík, B. Dolenský, I. Frydrych, M. Hajdúch, M. Kolář, K. Bogdanová, J. Králová, P. Džubák, V. Král: Caffeine-hydrazones as anticancer agents with pronounced selectivity toward T-lymphoblastic leukaemia cells. *Bioorg. Chem.* 60 (2015) 19-29].

Hydrazony nesoucí 2-hydroxyarylovou nebo 2-N-heterocyklickou skupinu mají vazebné účinky vůči celé řadě iontů přechodných kovů. Vazba kovů je zajištěna díky kyslíkovým a dusíkovým donorním skupinám. Vazebné místo je tak tvořeno karbonylovým kyslíkem hydrazonu, enamínovým dusíkem nebo heteroaromatickým dusíkem [R. Kaplánek, M. Havlík, B. Dolenský, J. Rak, P. Džubák, P. Konečný, M. Hajdúch, J. Králová, V. Král: Synthesis and biological activity evaluation of hydrazone derivatives based on a Tröger's base skeleton. *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 1651-1659; J. Rak, R. Kaplánek, T. Štulcová, P. Drašar, M. Havlík, T. Bříza, P. Džubák, M. Hajdúch, P. Konečný, J. Štěpánková, J. Králová, V. Král: Cholylyhydrazony a jejich použití k léčbě nádorových onemocnění a leukémií, Patent, CZ305607 B6 (2016)]. Pro zvýšení biodostupnosti látek se často používá modifikátor absorpce, tedy látka či skupina zvyšující (podporující) vstřebávání hydrofobních biologicky aktivních látek. Tento modifikátor absorpce může být k biologicky aktivní části molekuly kovalentně navázán. Jako skupiny zvyšující biodostupnost se obvykle používají deriváty sterolů a žlučových kyselin [J. Tamminen, E. Kolehmainen: Bile Acids as Building Blocks of Supramolecular Hosts. *Molecules* 6 (2001) 21-46; W. Kramer, G. Wess, A. Enhsen, E. Falk, A. Hoffmann, G. Neckermann, G. Schubert, M. Urmann: Modified bile acids as earners for peptides and drugs. *J. Control. Release* 46 (1997), 17-30; A. Enhsen, W. Kramer, G. Wess: Bile acids in drug discovery. *Drug Discov. Today* 3 (1998) 409-418; M. Mikov, J. P. Fawcett, K. Kuhajda, S. Kevresan: Pharmacology of Bile Acids and their Derivatives: Absorption Promoters and Therapeutic Agents. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 31 (2006) 237-251; E. Virtanen, E. Kolehmainen: Use of bile acids in pharmacological and supramolecular applications. *Eur. J. Org. Chem.* (2004) 3385-3399; W. Kramer: Transporters, Trojan horses and therapeutics: suitability of bile acid and peptide transporters for drug delivery. *Biol. Chem.* 392 (2011) 77-94; E. Sievänen: Exploitation of Bile Acid Transport Systems in Prodrug Design. *Molecules* 12 (2007) 1859-1889].

V případě vybraných RNA-transportérů na bázi hydrazonů bylo zjištěno, že snadno prochází nepolární membránou buňky a některé i tkáňovými bariérami. Vybrané deriváty hydrazonů jsou díky svým vlastnostem vhodné pro vazbu na buněčné povrchy s centry záporně nabitých funkčních skupin a mohou tak sloužit jako transportéry nukleotidových struktur. Vytvořené komplexy těchto derivátů jsou reverzibilní a umožňují uvolnění léčiva (oligonukleotidových struktur) po vstupu do vnitřního buněčného prostoru.

Deriváty hydrazonů použitelné jako transportéry RNA a nukleotidových struktur a jejich použití jako terapeutický nástroj pro cílení léku pro nádorovou imunoterapii jsou předmětem tohoto patentu.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou komplexy RNA-transportér, kde transportér je na bázi hydrazonů, použitelné především jako terapeutický nástroj pro cílení léku pro nádorovou imunoterapii. S využitím spektroskopických metod a s pomocí PAMPA byly stanoveny efektivní parametry

stabilizace transportního komplexu pro prostup biologickou membránou, dále dopravní účinnost transportérů a cytotoxicita nových nosičů a jejich chemicko-fyzikální vlastnosti pro tvorbu komplexu RNA-transportér.

- 5 Vybrali jsme transportéry na bázi hydrazonů, které jsou schopné s nukleotidovými řetězci, tedy s nukleovými kyselinami (RNA, DNA a jejich fragmenty) tvořit stabilní komplexy, které po průchodu přes membránu do vnitřního prostoru buněk molekuly RNA, případně její fragmenty opět uvolní. Schéma 1 zobrazuje vznik komplexu transportér-nukleová kyselina.
- 10 Mechanismus transportu je, že transportér je k molekule RNA nekovalentně vázán přes kolumbickou interakci, zejména na fosfodiesterovou vazbu. Takto molekuly transportéru obalí molekulu RNA a díky nábojové neutralitě navržených struktur tento komplex snadno prochází membránou, a nezávisí tak na jeho velikosti. Je tak možný transport jak fragmentů RNA/DNA, tak celých molekul.

15

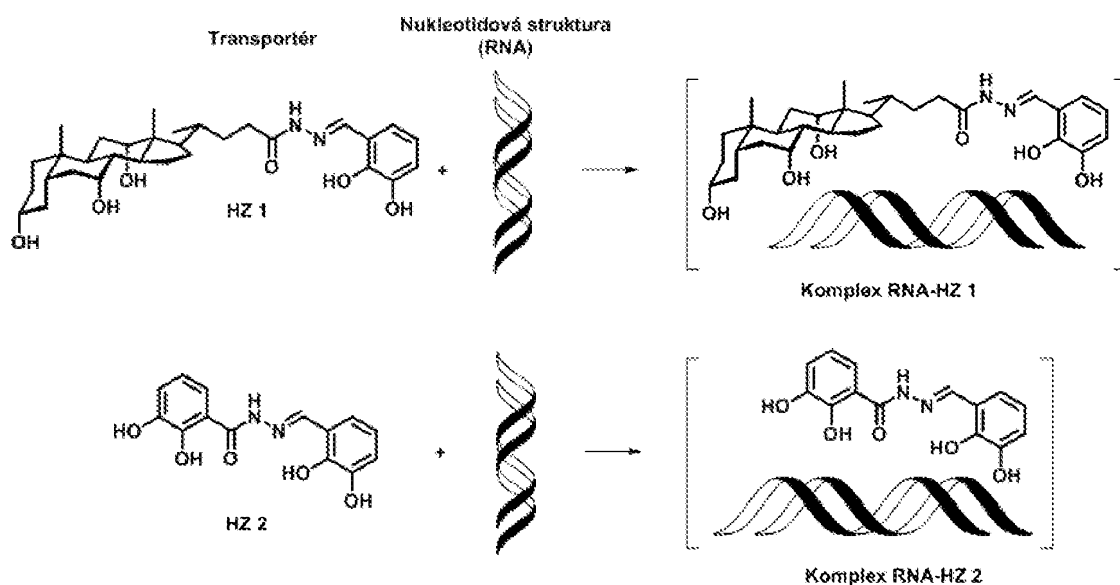


Schéma 1. Tvorba komplexů RNA-transportér

- Tyto transportéry velice účinně přenášejí RNA přes buněčné membrány. Jejich vlastnosti jsme testovali na syntetických modelových buněčných membránách. Byly stanoveny koncentrace RNA, které jsou transportéry schopné přes membránu dopravit. Také byly stanoveny konstanty stability kvantifikující sílu vazby molekuly v komplexu a jejich vyvázání po průchodu membránou. Také bylo zjištěno, že velmi záleží na molárním poměru mezi transportérem a transportovanou RNA. Desetinásobný a vyšší přebytek transportéru nemá pozitivní vliv na účinnost transportu do buněk. Naopak má negativní dopad na transportovatelnost vzniklého komplexu.

- Interakce RNA se syntetickými transmembránovými nosiči způsobuje významné změny její nativní konformace. Tyto změny byly sledovány a rozpoznány díky ECD výsledného komplexu. Ramanova (ROA) spektra RNA odrážejí její konformační stav a poskytují informaci o uspořádání nukleových bází. Tato metoda poskytuje jedinečnou možnost sledovat komplexaci syntetických transmembránových nosičů s RNA na supramolekulární úrovni a detekovat vhodné konformační a strukturální změny v molekulách.

- 35 Studovali jsme transport RNA pomocí PAMPA testu s deriváty na bázi hydrazonů, RNA/DNA od krmných kvasnic ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS). Měření ukázalo, že testované sloučeniny HZ 1 a HZ 2 působí jako efektivní transportéry.

Objasnění výkresů

- 5 Obrázek 1. Spektra ECD a ROA (elektronový cirkulární dichroismus a ramanova optická aktivita) zobrazující tvorbu komplexu RNA jednotlivých transportérů - HZ 1, HZ 2, číselné označení příkladu, dle kterého byly připraveny.

- Obrázek 2. Graf závislosti absorbance na vlnové délce při rozdílných koncentracích RNA a transportéru pro stanovení konstanty stability transportéru dle příkladu 4.

Obrázek 3. Cytotoxicita nových transportérů.

15 Příklady uskutečnění vynálezu

- Pro charakterizaci navržených komplexů – transportérů RNA byly využity následující analytické metody: UV-Vis spektroskopie, elektronový cirkulární dichroismus a ramanova optická aktivita (UV-VIS, ECD a ROA). Mezi strukturálními metodami s rozlišením – Ramanova spektroskopie orientovaná na vlnčet polohy vibrací chemických vazeb, elektronový cirkulární dichroismus (ECD) poskytuje informace o struktuře malých chorálních biologicky významných molekul v roztocích. Spektra ECD byla měřena na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko při teplotě 22 °C v křemenné kyvetě o tloušťce 0,01 cm (Hellma, Německo). ROA spektra byla měřena na spektrometru ChiralRaman-2X (Biotools, USA), který je vybaven laserem Opus (Laser Quantum, Velká Británie).

- Různé typy RNA jsou opticky aktivní molekuly mající charakteristické sekundární a terciární struktury. Forma A je typická konformace nativní RNA rozpuštěné v neutrálním pufru se střední iontovou silou. Roztok RNA testovaný za výše uvedených podmínek demonstruje dva pásy ECD, tj. negativní při 210 nm a pozitivní při 260 nm. Obě tyto pásma jsou charakteristická pro formu A.

Příklad 1. Transportér HZ 1

- 35 Příprava derivátu HZ 1: cholylylhydrazonový derivát byl připraven postupem popsáním v literatuře [A. J. M. Rasras, T. H. Al-Tel, A. F. Al-Aboudi, R. A. Al-Qawasmeh: Synthesis and antimicrobial activity of cholic acid hydrazone analogues. Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 2307-2313]. Cholylylhydrazid (127 mg; 0,3 mmol) a 2,3-dihydroxybenzaldehyd (69 mg; 0,5 mmol) byly rozpuštěny v ethanolu (25 ml) a reakční směs byla míchána při 75 °C 2 dny. Poté byla směs odpařena do sucha a odparek byl suspendován v diethyletheru (80 ml). Pevný produkt byl odfiltrován, promyt diethyletherem (60 ml) a usušen ve vakuu při 50 °C. Bylo získáno 153 mg (94 %) *N*-(2,3-dihydroxybenzyliden)cholylylhydrazidu (HZ 1). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 0,59 (s, 3H); 0,81 (s, 3H); 0,75 až 2,50 (m, 30H); 3,60 (m, 1H); 3,79 (m, 1H); 4,04 (m, 1H); 6,71 až 7,04 (m, 3H); 8,24 a 8,28 (2x s, 1H); 9,19 a 9,39 (2x s, 1H); 10,84 a 11,16 (2x s, 1H); 11,07 a 11,61 (2x s, 1H).

- V získaných spektrech A lze pozorovat pásy (2 negativní pásy s maximem 240 nm a 337 nm a pozitivní pás s maximem 270 nm, 284 nm, 323 nm, 352 nm), které odpovídají vznikajícímu komplexu transportér-RNA. Při porovnání spekter samotné RNA a komplexu transportér-RNA vychází rozdíl v intenzitě pásů charakteristických pro RNA a transportér HZ 1. V získaných spektrech ROA lze pozorovat negativní pásy s maximem 240 nm a 337 nm a pozitivní pásy s maximem 270 nm, 284 nm, 323 nm a 352 nm, které odpovídají vznikajícímu komplexu s RNA.

Příklad 2. Transportér HZ 2

- Příprava HZ 2: benzhydrazonový derivát byl připraven postupem popsáným v literatuře pro jiné aroylhydrazony [J. Rak, R. Kaplánek, V. Král, J. Králová, T. Štulcová, P. Drašar: Konjugáty hydrazonů s kyselinou cholovou jako nová cytostatika. Patent CZ304112 B6 (2013); R. Kaplánek, M. Havlík, B. Dolenský, J. Rak, P. Džubák, P. Konečný, M. Hajdúch, J. Králová, V. Král: Synthesis and biological activity evaluation of hydrazone derivatives based on a Tröger's base skeleton. Bioorg. Med. Chem. 23 (2015) 1651-1659].
- 2,3-Dihydroxybenzohydrazid (168 mg; 1 mmol) a 2,3-dihydroxybenzaldehyd (138 mg; 1 mmol) byly smíseny v isopropanolu (15 ml). Reakční směs byla míchána při 80 °C 2 dny, poté odpařena do sucha. Surový produkt byl suspendován ve směsi diethylether-hexan (1:1 v/v, 80 ml), pevný produkt byl odfiltrován a promyt směsí diethylether-hexan (1:1 v/v, 60 ml) a usušen ve vakuu při 50 °C. Bylo získáno 249 mg (86 %) *N*-(2,3-dihydroxybenzyliden)-2,3-dihydroxybenzhydrazidu (HZ 2). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,76 (m, 2H); 6,87 (dd, *J* = 7,9, 1,6 Hz, 1H); 7,00 (m, 2H); 7,35 (dd, *J* = 8,1, 1,5 Hz, 1H); 8,65 (s, 1H); 9,29 (s, 1H); 9,43 (s, 1H); 10,96 (s, 1H); 11,73 (bs, 1H); 12,09 (s, 1H).

- Samotný derivát HZ 2 byl již dříve patentován a publikován, byla popsána jeho alternativní syntéza [T. R. Burke, Jr., X. Z. Zhao, E. A. Semenova, K. Maddali, Y. Pommier: Hydrazide, amide, phthalimide and phthalhydrazide analogs as inhibitors of retroviral integrase. Patent WO/2009/026248 (2009); X. Z. Zhao, E. A. Semenova, B. C. Vu, K. Maddali, C. Marchand, S. H. Hughes, Y. Pommier, T. R. Burke, Jr.: 2,3-Dihydro-6,7-dihydroxy-1*H*-isoindol-1-one-Based HIV-1 Integrase Inhibitors. J. Med. Chem. 51 (2008) 251-259].

- V získaném ECD spektru transportéru HZ 2 lze pozorovat 2 negativní pásy s maximem 217 nm a 274 nm a pozitivní pásy s maximem 207 nm, 274 nm, 301 nm. Při porovnání spekter samotné RNA a komplexu transportér-RNA vychází rozdíl v intenzitě pásů charakteristických pro RNA a transportér HZ 2. V získaných spektrech ROA lze pozorovat negativní pásy s maximem 217 nm a 276 nm a pozitivní pásy s maximem 255 nm a 316 nm, které odpovídají vznikajícímu komplexu s RNA.

Příklad 3. Test účinnosti transportérů HZ 1 a HZ 2 pro RNA pomocí PAMPA

- V této studii byla použita metoda PAMPA (paralelní analýza permeability umělou membránou). Tato *in vitro* metoda umožňuje stanovit transportní vlastnosti látek přes fosfolipidové vrstvy. Sestava se skládá z jamek, které tvoří donorové a akceptorové mikrotitrační desky. Celá sestava se běžně označuje jako sendvič. Na začátku testu je látka přidána do donorové části. Do ní se vloží akceptorová destička s fosfolipidovou membránou na dně. Během inkubace dochází k transportu RNA pomocí transportérů RNA do akceptorové části. Po ukončení inkubace je proměřena koncentrace RNA v akceptorové i donorové destičce. Tím se kvantifikuje množství transportované RNA.

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

- Donorová destička byla naplněna 300 μl zředěného nosiče o třech koncentracích ($c_{\text{transportér}} = 0,1/1/10 \text{ mM}$) + RNA ($c_{\text{RNA}} = 0,05 \text{ mM}$). Koncentrace RNA byla vztažena na monomerní jednotku. Akceptorové jamky byly naplněny 200 μl roztoku pufru (pH = 7,4). Donorová destička byla vložena do akceptorové destičky ve spodní části. Takto propojené destičky fosfolipidovou membránou byly inkubovány při teplotě 25 °C v uzavřené nádobě po dobu 2 h bez míchání. Po uplynutí doby se sendvičové desky oddělily. Množství (koncentrace) RNA v jamkách

donorových a akceptorových destiček bylo změřeno na základě porovnání experimentálního spektra s UV spektrem (220~800 nm) získaným z referenčních standardů.

- 5 V tabulce 1 jsou shrnuty výsledky testu účinnosti transportérů HZ 1 a HZ 2 pro RNA pomocí PAMPA (jako hodnoty K_{ass}). Nejefektivnější intracelulární transport vykazoval HZ 2 transportér (nejvyšší hodnoty K_{ass}).

Tabulka 1. Transportní vlastnosti

Transportér*	$\log K_{ass}$
HZ 1	3,500
HZ 2	4,905

- 10 * $C_{transportér} = 0,1 \text{ mM}$; $C_{RNA} = 0,05 \text{ mM}$; $\lambda/nm = 255 \text{ nm}$)

Příklad 4. Cytotoxicita nových transportérů

- 15 Primární leukemické buňky (PLC) – 200 μm 4T1 byly inkubovány 2 hodiny s novými transportními látkami C (0,1/1/10 mM). Výsledky testů prováděné na několika buněčných liniích (PLC-4T1) neprokázaly žádný výrazný cytotoxický účinek transportérů na testované buňky (obr. 3), což znamená, že připravené transportéry nejsou toxické a jsou vhodné pro *in vitro* a *in vivo* použití.

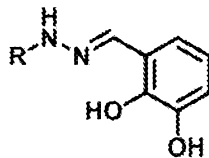
20

Průmyslová využitelnost

- 25 Vynález je využitelný ve farmaceutickém průmyslu, jako efektivní komplex RNA-transportér na bázi hydrazonů, použitelný především jako terapeutický nástroj pro cílení léku pro nádorovou imunoterapii.

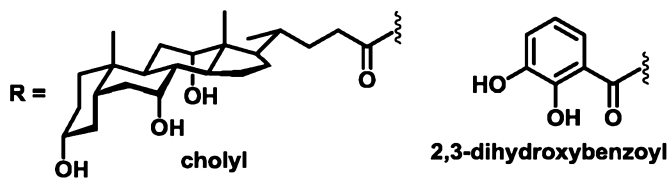
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Použití 2,3-dihydroxybenzyliden hydrazidů obecného vzorce I,



(I),

- 10 kde R je cholyl nebo 2,3-dihydroxybenzoyl,

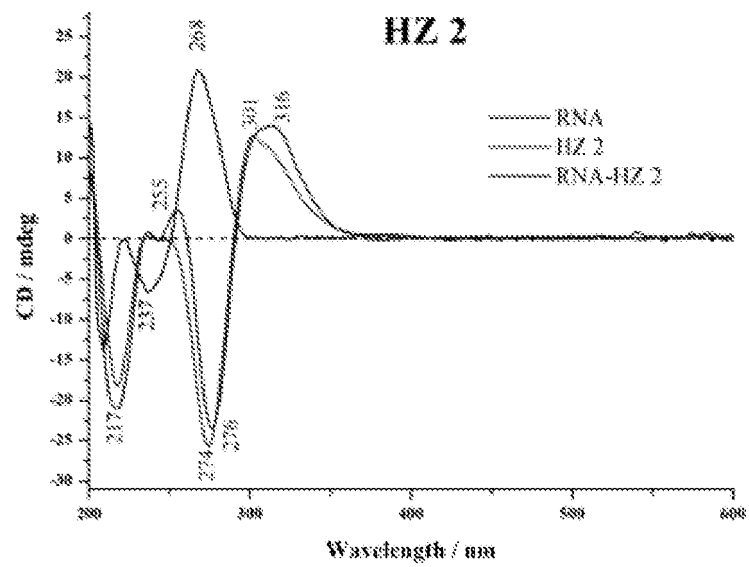
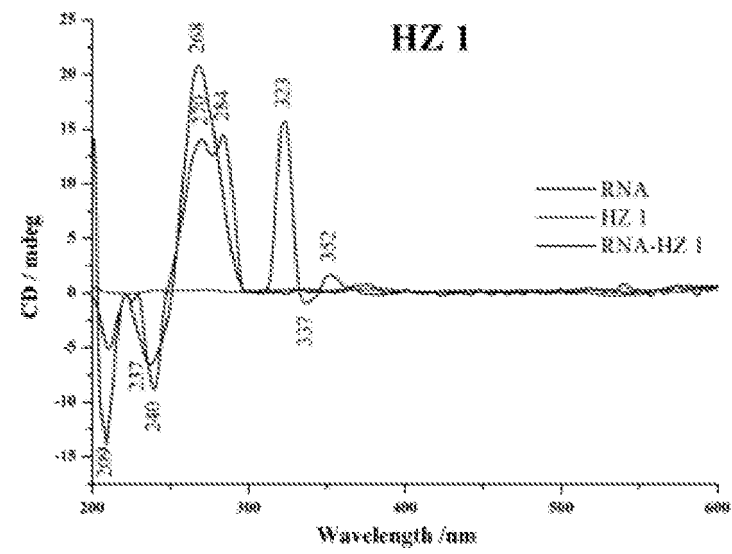


- 15 pro přípravu transportérů nukleotidových struktur, kde nukleotidovými strukturami jsou řetězce a fragmenty RNA nebo DNA.

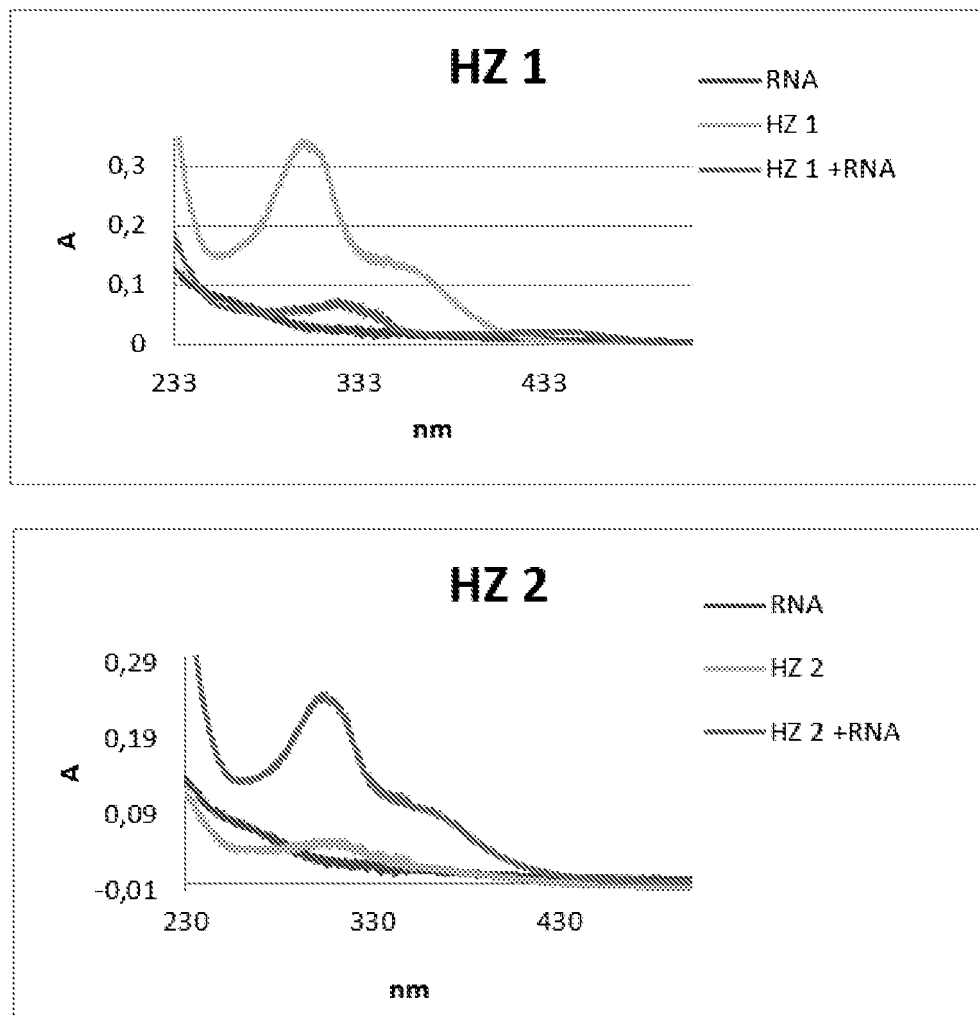
2. Použití transportérů podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro nádorovou imunoterapii.
3. Použití transportérů podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro léčbu onkologických onemocnění.

20

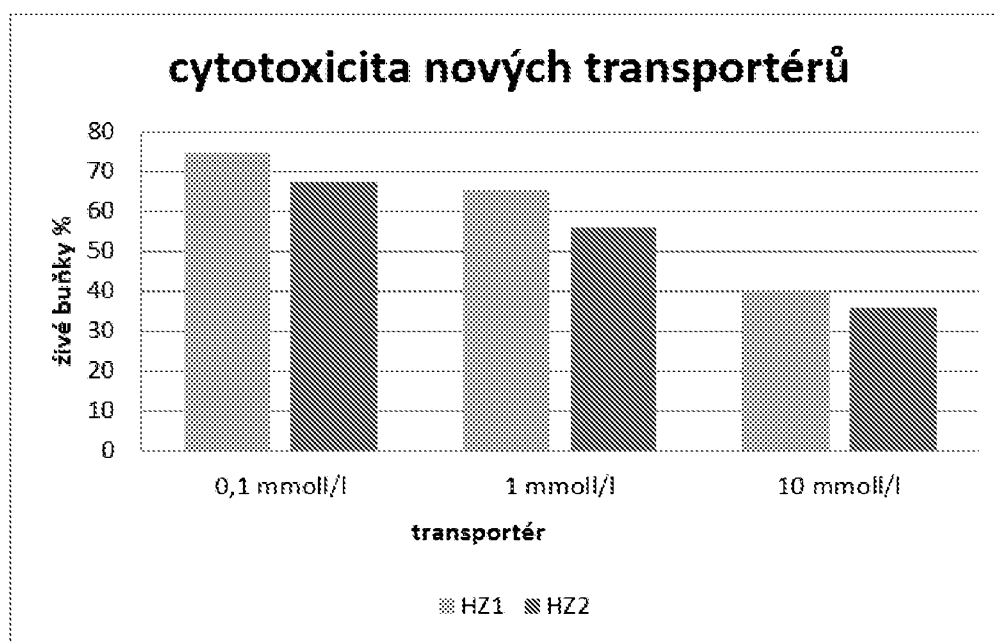
3 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3