PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2000 -1158

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 07 K 7/06
C 09 B 11/24
C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/70
G 01 N 33/48
G 01 N 33/574
C 12 P 17/06

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.10.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.10.1997 03.03.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/061582 1998/033661**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/21231**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/18856**

(71) Přihlašovatel:
CYTOVIA, INC., San Diego, CA, US;

(72) Původce:
Weber Eckard, San Diego, CA, US;
Cai Sui Xiong, Foothill Ranch, CA, US;
Keana John F. W., Eugene, OR, US;
Drewe John A., Costa Mesa, CA, US;
Zhang Han-Zhong, Irvine, CA, US;

(74) Zástupce:
Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Nové fluorescentní reportní molekuly a jejich použití včetně testů na kaspázy

(57) Anotace:

Popisují se nová fluorescenční barviva, nové fluorogenní a fluorescenční reportní molekuly a nové způsoby testování enzymů, které se mohou použít k detekci aktivity kaspáz a jiných enzymů, které se účastní apoptózy v celých buňkách, buněčných liniích a ve vzorcích tkáně získaných z živého organizmu nebo orgánu. Reportní molekuly a způsoby testování se mohou použít při testování léků za účelem identifikace látek, které působí jako inhibitory nebo induktory kaspázové kaskády v celých buňkách nebo tkáních. Zde popsaná činidla a testy se mohou také použít při stanovení chemosenzitivity lidských buněk zhoubného bujení za účelem léčby pomocí chemoterapeutických léků. Vynález se také týká nových gluorogenních nebo fluorescenčních reportních molekul a nových způsobů testování enzymů, které se mohou použít při detekci aktivity aminopeptidázy methioninu typ 2, dipeptidyl-peptidázy IV, kalpainu, aminopeptidázy, proteázy HIV, adenovirové proteázy, proteázy HSV-1, proteázy HCMV a proteázy HCV.

CZ 2000 - 1158 A3

12.06.00

PV 2000-1158

Nové fluorescentní reportní molekuly a jejich použití včetně testů na kaspázy

Oblast vynálezu

Vynález se týká vnitrobuněčné detekce enzymů za použití fluorogenních a fluorescenčních sond. Vynález se týká nových fluorescenčních barviv a jejich aplikace při přípravě nových fluorogenních nebo fluorescenčních peptidů nebo aminokyselinových derivátů, které slouží jako substráty proteáz a peptidáz. Vynález se zvláště vztahuje k novým fluorogenním nebo fluorescenčním peptidovým derivátům, které tvoří substráty enzymů podílejících se na apoptóze Jsou to kaspázy a z lymfocytů získaná serinová proteáza granzym B. Vynález se také týká způsobu měření aktivity kaspáz a jiných enzymů, který se účastní apoptózy v živých a mrtvých celých buňkách, buněčných liniích nebo ve vzorcích tkáně získaných ze zdravého, nemocného, infikovaného nebo rakovinového orgánu nebo tkáně. Vynález se také týká použití fluorogenních a fluorescenčních substrátů v novém testovacím systému vhodném pro zkoumání nebo detekci inhibitorů nebo induktorů apoptózy ve sbírkách nebo knihovnách látek. Dále se vynález týká použití fluorogenních nebo fluorescenčních substrátů při stanovení citlivosti rakovinových buněk při ošetření chemoterapeutickými léky. Vynález se dále týká nových fluorogenních nebo fluorescenčních peptidových derivátů, které slouží jako substráty exopeptidáz, jako je aminopeptidáza A a N, aminopeptidáza methioninu a dipeptidyl-peptidáza IV, endopeptidáz, jako je kalpain, proteáz, jako jsou HIV proteázy, HCMV proteáza, HSV proteáza, HCV proteáza a proteáza adenoviru.

Dosavadní stav techniky

Organizmy odstraňují nežádoucí buňky procesem, který je znám jako regulované odumírání buněk, programované odumírání buněk nebo apoptóza. K takové normální buněčné smrti dochází v normálním případě při vývoji zvířat, stejně jako při homeostáze a při stárnutí (Glucksmann, A., Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 26: 59-86 (1951), Glucksmann, A., Archives de Biologie 76: 419-437 (1965), Ellis et al., Dev. 112: 591-603 (1991), Vaux et al., Cell 76: 777-779 (1994)). Apoptóza reguluje počet buněk, umožňuje morfogenezi, odstraňuje poškozené nebo jinak abnormální buňky a eliminuje buňky , které již uskutečnily svou funkci. Navíc apoptóza se objevuje jako odezva při různých fyziologických stresech, jako je hypoxie nebo ischemie (popisuje se v dokumentu přihláška PCT WO96/20721).

V buňkách, které prochází regulovaným odumíráním, dochází k řadě morfologických změn. Tyto změny zahrnují tvoření dutin v plazmatické a jaderné membráně, smršťování buněk (kondenzace jaderné plazmy a cytoplazmy), změnu polohy organel a zhušťování, kondenzaci chromatinu a produkci apoptických tělísek (membrána uzavírá částice obsahující vnitrobuněčný materiál) (popisuje se v publikaci Orrenius, S., J. Internal Medicine 237: 529-536 (1995)).

Apoptózy je možné dosáhnout endogenním mechanizmem buněčné sebevraždy (Wyllie, A. H., Cell Death in Biology and Pathology, Bowen and Lockshin, eds., Chapman and Hall (1981), pp. 9-34). Buňka aktivuje svůj vnitřně kódovaný program odumírání na základě buď vnitřních nebo externích signálů. Program odumírání se provádí aktivací přesně regulovaného genetického programu (popisuje se v publikacích Wylie et al., Int. Rev. Cyt. 68: 251 (1980), Ellis et al., Ann. Rev. Cell Biol. 7: 663 (1991)). Před lyzí je možné apoptické buňky a tělíska obvykle rozeznat a odstranit okolními buňkami nebo makrofágy. Vzhledem k tomuto čistícímu mechanizmu nedojde při odstraňování velkého počtu buněk k vyvolání zánětu (popisuje

12.06.00

se v publikaci Orrenius, S., J. Internal Medicine 237: 529-536 (1995)).

Orrenius, S., J. Internal Medicine 237: 529-536 (1995)).

Savčí interleukin-1β má důležitou úlohu v různých patologických procesech. Tyto procesy zahrnují chronický a akutní zánět a autoimunitní onemocnění (popisuje se v publikaci Oppenheim, J. H. et al., Immunology Today, 7, 45-56 (1986)). IL-1β se syntetizuje jako s buňkou spojený prekurzorový polypeptid (pre-IL-1β), který není schopen vázat receptory IL-1 a není biologicky aktivní (popisuje se v publikaci Mosley et al., J. Biol. Chem. 262: 2944 (1987)). Inhibicí konverze prekurzoru IL-1β na zralý IL-1β je možné inhibovat aktivitu interleukinu-1. IL-1 je také cytokin, který zprostředkovává široké rozmezí biologických odezev. Mezi tyto odezvy patří zánět, septický šok, hojení ran, krvetvorba a růst jistých leukémií. (popisuje se v publikaci Dinarello, C. A., Blood 77: 1627-1652 (1991), diGiovine et al., Immunology Today 11: 13 (1990)). Enzym měnící interleukin-1β (ICE) je proteáza odpovídající za aktivaci interleukinu-1β (IL-1β) (popisuje se v publikaci Thornberry, N. A., et al., Nature, 356: 768 (1992), Yuan, J. et al., Cell 7: 641 (1993)). ICE je substrátově specifická proteáza cysteinu, která štěpí neaktivní prointerleukin-1 za vzniku zralého IL-1. Geny, které kódují ICE a CPP32, jsou členy savčí rodiny genů ICE/Ced-3, která zahrnuje alespoň dvanáct členů: ICE, CPP32/Yama/Apopain, mICE2, ICE4, ICH1, TX/ICH_2, MCH2, MCH3, MCH4, FLICE/MACH/MCH5, ICE-LAP6 a ICEre1III. Proteolytická aktivita této rodiny cysteinových proteáz, jejichž aktivní místo cysteinového zbytku je podstatné při apoptóze zprostředkované ICE, se jeví být kritická při zprostředkování úmrtí buňky (popisuje se v publikaci Miura et al., Cell 75: 653-660 (1993)). Tato genová rodina se pojmenovala kaspázy (popisuje se v publikaci Alnernri, E. S. et al., Cell, 87: 171 (1996)).

12.06.00

Spouštěč procesu odumírání, jako je nádor nekrotizující faktor, FAS-ligand, nedostatek kyslíku nebo nutrientů, viry, toxiny, léky s účinky proti zhoubnému bujení atd., mohou aktivovat kaspázy v buňce způsobem podobným kaskádě. To znamená, že kaspázy na horním konci kaskády (například FLICE/MACH/MCH5) mohou aktivovat kaspázy dále v kaskádě (například CPP-32/Yama/Apopain). Aktivace kaspázové kaskády vede k odumírání buněk.

Dostatek vědeckých důkazů naznačuje, že u mnoha onemocnění se kaspázová kaskáda aktivuje v případě, kdy to není žádoucí. To vede k nadměrnému odumírání buněk a porušení orgánů. Onemocnění zahrnující nesprávnou aktivaci kaspázové kaskády a následné úmrtí buněk zahrnuje infarkt myokardu, městnavé srdeční selhání, autoimunitní onemocnění, AIDS, virovou infekci, selhání ledvin, selhání jater, revmatoidní artritidu, ischemická mrtvice, neurodegenerativní onemocnění, aterosklerózu atd.. Velkým přínosem pro léčbu degenerativních onemocnění většiny, ne-li všech, orgánových systémů v lidském těle by bylo objevení nových léků, které mohou blokovat nebo inhibovat aktivaci kaspázové kaskády.

Uvažuje se, že kaspázy jsou také podstatné při vývoji a léčbě zhoubného bujení. Existují důkazy, že buňky zhoubného bujení, zatímco obsahují kaspázy, neobsahují části molekulárního mechanizmu, které aktivují kaspázovou kaskádu (popisuje se v publikaci Los et al., Blood, Vol. 90, No. 8: 3118-3129 (1997)). Tyto případy buněk zhoubného bujení ztratí schopnost odumírat a stávají se buňkami zhoubného bujení.

Ukázalo se, že chemoterapeutické (anti-karcinogenní) léky mohou donutit buňky k odumírání opětnou aktivací latentní kaspázové kaskády. To může být kritický aspekt způsobu působení většiny, ne-li všech, známých léků působících proti zhoubnému bujení (popisuje se v publikaci Los et al., Blood, Vol. 90, No: 8: 3118-3129 (1997), Friesen et al., Nat. Med. 2: 574 (1996)). Chemoterapeutické léky se mohou lišit svou

12.06.00

kapacitou aktivovat kaspázový systém u různých tříd zhoubného bujení. Je však pravděpodobné, že léky proti zhoubnému bujení se liší svou schopností aktivovat kaspázovou kaskádu u daného typu rakoviny (například u zhoubného bujení plic) a u různých pacientů. Jinými slovy existují rozdíly mezi pacienty v chemocitlivosti vůči různým lékům určeným na léčbu zhoubného bujení (například buňky zhoubného bujení v plicích).

Nadměrná aktivace kaspázové kaskády má důležitou úlohu při degenerativním onemocnění různých orgánů. V případě, že kaspázový systém není funkční, je to charakteristický znak pro buňky zhoubného bujení. Nové léky, které inhibují nebo stimulují kaspázovou kaskádu, mohou pravděpodobně způsobit převrat při léčbě řady lidských onemocnění, jako je infekční, kardiovaskulární, endokrinní, ledvinové, jaterní a mozkové onemocnění až k onemocnění imunitního systému a zhoubnému bujení.

Za účelem najít léky, které inhibují nebo stimulují kaspázovou kaskádu, je nezbytné vyvinout testy pro hodnocení kaspázové aktivity s vysokou průchodností (HTCA). Tyto testy HTCA musí být schopny monitorovat aktivaci a inhibici kaspázové kaskády uvnitř živých a celých buněk. V ideálním případě test HTCA může být dostatečně univerzální, aby se mohly měřit aktivity kaspázové kaskády uvnitř libovolné živé nebo celé buňky, přičemž nezávisí na původu buňky: buňky zhoubného bujení, nádorové buňky, imunitní buňky, mozkové buňky, buňky endokrinního systému, buňky nebo buněčné linie z různých orgánových systémů, vzorky biopsií atd.. Takové testy HTCA by měly být schopny měřit v živých a celých buňkách aktivaci nebo inhibici libovolných kaspázových enzymů nebo libovolných jiných enzymů, které se účastní v kaspázové kaskádě. Vývoj takových univerzálních testů HTCA reprezentuje podstatnou výhodu v oboru testování léků.

V současné době dostupné testy HTCA neumožňují testování látek uvnitř buněk, které mohou buď aktivovat nebo inhibovat

12.06.00

kaspázovou kaskádu. Existují pouze bezbuněčné testy s vysokou průchodností, které mohou měřit aktivitu jednotlivých izolovaných kaspázových enzymů, nebo testy, které mohou měřit aktivitu kaspáz při odumírání buněk, které procházejí na základě osmotického šoku (popisuje se například v publikaci Los et al., Blood, Vol. 90 8: 3118-3129 (1997)). Tyto enzymatické testy nemohou předpovědět účinek látky v kaspázové kaskádě v živé buňce z následujících důvodů:

1. Bezbuněčné testy nebo testy používající mrtvé, permeabilizované buňky, nemohou předpovědět schopnost látek procházet buněčnou membránu. To je kritické, protože kaspázová kaskáda probíhá uvnitř buněk. Za účelem být aktivní, nemusí látka být pouze schopna projít nedotčenou buněčnou membránou. Bezbunečné testy nebo testy používjící mrtvé buňky nejsou proto schopné stanovit, zda látka je použitelná jako lék.
2. Izolavané kaspázy v bezbuněčných testech jsou vysoce citlivé vůči oxidaci a vůči látkám, které mohou způsobovat oxidaci enzymů. Tato vlastnost izolovaných kaspáz činní bezbuněčné testy pro testování kaspáz vysoce citlivý vůči artefaktu a může zabránit úspěšnému použití těchto testů při testování kombinačních (nebo jiných) chemických knihoven. Předchozí masové testovací úsilí vedlo k objevení řady inhibitorů, které oxidují kaspázy. Neobejvila se však sloučenina, které je možno použít jako lék. Podobné problémy zaznamenaly i ostatní odborníci.
3. Řada buněčných receptorů, proteinů, buněčných konstituentů a kofaktorů, přičemž řada z nich není dosud známa, může ovlivnit kaspázovou kaskádu v živých buňkách. Bezbuněčné kaspázové testy nebo testy používající permeabilizované, mrtvé buňky neberou do úvahu uvedené buněčné receptory a kofaktory. Vzhledem k tomu je možné, že látka identifikovaná v bezbuněčném kaspázovém testu nebo v testu používajícím mrtvé buňky nebude fungovat

12.06.00

v živých buňkách. Na druhou stranu látka, která může inhibovat nebo stimulovat kaspázovou kaskádu nepřímo prostřednictvím jednoho z celulárních receptorů nebo kafaktorů bude celkově chybět v bezbuněčném kaspázovém testu nebo v kaspázovém testu, kde se využívají mrtvé buňky.

4. Je vysoce pravděpodobné, že kaspázová kaskáda funguje odlišně u různých typů buněk. Při použití bezbuněčných testů nebo testů s mrtvými buňkami je prakticky nemožné identifikovat modulátory kaspázové kaskády pro určitý typ buňky nebo orgán.

Potencionálně důležitá aplikace systému testů HTCA při měření intracelulárních kaspázových enzymů nebo jiných enzymů, které se podílejí na apoptóze, je chemosenzitivita testování zhoubného bujení u lidí. Je známo, že existuje genetický rozdíl v citlivosti lidského zhoubného bujení vůči v této době používaným lékům účinným proti zhoubnému bujení. Například buňky zhoubného bujení plic u jednoho pacienta mohou být citlivé na lék A, zatímco zhoubné bujení v plicích jiného pacienta není citlivé na lék A, ale je citlivé na lék B. Tento farmakogenetický rozdíl chemosenzitivity buněk zhoubného bujení u různých jednotlivců je dobře známý jev.

V minulosti se provedl pokus stanovit chemosenzitivitu buněk zhoubného bujení získaných od jednotlivých pacientů dříve než se stanovil léčebný režim jedním nebo více léky proti zhoubnému bujení. Testování chemosenzitivity se příliš nerozšířilo, protože zahrnuté procedury měly některé inherentní technické obtíže. Testování bylo velmi časově náročné (šest nebo více dní na jeden test) a před testováním je nutná kultivaci buněk. Buněčné kultury vedou k lokální selekci buněk a kultivované buňky pak už dále nepředstavují zhoubné bujení pacienta. Testovací systém HTCA, který je vhodný pro rychlé měření vnitrobuněčné kaspasové aktivity, se

12.06.00

může použít při rychlém stanovení profilu chemosenzitivity čerstvě získaných buněk zhoubného bujení. Jestliže testy mají vysokou průchodnost, je možné testovat chemosenzitivitu více vzorků odebraných ze stejného pacienta. To jsou například různé metastázy. Tato informace se pak může použít k vytvoření léčebného režimu za použití kombinací léků proti zhoubnému bujení, které jsou dostupné na trhu, s těmi, vůči nimž buňky vykazují největší citlivost.

Je zřejmé, že je nutné vytvořit testy HTCA a činidla vhodná pro takové testy, které se mohou použít při objevování léků nebo diagnostických postupů, za účelem rychlé detekce a měření aktivity látek, které aktivují nebo inhibují kaspázovou kaskádu nebo jiné enzymy, jenž se podílejí na apoptóze uvnitř živé nebo mrtvé celé buňky. Činidlo vhodné pro tento typ testu by mělo v ideálním případě splňovat následující podmínky:

a) měl by existovat velký rozdíl fluorescenčního signálu mezi molekulou peptidového reporteru a molekulou reporteru po té, co amidová vazba v peptidové reporteru se štěpí kaspázou nebo jinými enzymy, které se účastní apoptózy. Upřednostňuje se, aby molekula peptidového reportera nebyla fluorescenční a více se upřednostňuje, aby molekula peptidového reportera nebyla fluorescenční a bezbarvá,

b) molekula peptidového reporteru by měla vstupovat do buňky. Z toho důvodu by měla obsahovat v molekule minimální počet hydrofilních skupin a velikost molekuly by měla být s výhodou malá,

c) molekula peptidového reporteru by neměla difundovat vně buňky po té, co projde buněčnou membránou,

d) reportní molekula by přednostně neměla difundovat vně buňky po té, co je uvolněna z peptidu.

Způsob testování inhibitorů nebo induktorů apoptózy v testech, kde se používají celé buňky, versus v bezbuněčných testech se může také použít při testování inhibitorů enzymů

12.06.00

jiných než kaspáz. Inhibitory enzymů se nejdříve identifikovaly v bezbuněčných enzymatických testech. Buněčné kultury se pak použily v sekundárních testech, aby se odhadla aktivita aktivních látek v neporušených buňkách. Buněčný permeabilní fluorogenní nebo fluorescenční substrát bude schopen testovat inhibitory proteáz a peptidáz a jiných enzymů přímo v živých celých buňkách. Ve srovnání s bezbuněčnými testy, testy s celými buňkami vykazují několik výhod. Jedna výhoda je, že v testech s celými buňkami musí inhibitor, aby se mohl detekovat, proniknout do buňky. Protože řada proteáz v živých buňkách se reguluje proteiny, receptory nebo geny, testování za použití živých buněk umožní identifikaci malých molekul látek, které interferují s buněčnými proteázami navázáním na aktivní místo, stejně jako látky, které upravují funkci proteáz tím, že interferují s transkripcí, translací, biosyntézou, sestavení podjednotek, s buněčnými kofaktory nebo signálními transdukčními mechanizmy (nebo vstupem viru do hostitelských buněk, jak je to v případě virových proteáz). Dále, protože v buňkách existuje dostatek aminopeptidáz, tyto aminopeptidázy se mohou využít při vytvoření fluorogenních nebo fluorescenčních substrátů vhodných pro testy s celými buňkami, které nebudou fungovat v bezbuněčných testech. Proto existuje nutnost vyvinout testy (HTS) s vysokou průchodností a činidla vhodná pro testy s celými buňkami, které se mohou použít při objevení léků nebo při diagnostických postupech.

AGM-1470 (také známo jako TNP-470) je inhibitor angiogeneze, který se používá při klinických studiích v případě různých druhů zhoubného bujení. Mechanizmus působení AGM-1470 objevily dvě nezávislé výzkumné skupiny (popisuje se v publikaci Sin, N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 6099-6103 (1997), Griffith, E. C., et al., Chem. Biol. 4: 461-471 (1997)). Zjistilo se, že AGM-1470 a jeho analogy jsou inhibitory aminopeptidázy methioninu typ 2 (MetAP-2). V případě série analogů AGM-1470 se zjistila síla inhibice

12.06.00

proliferace endoteliálních buněk a inhibice aktivity aminopeptidázy methioninu a stanovila se podstatná korelace mezi uvedenými dvěma aktivitami.

Protože inhibitory angiogeneze jsou známy, že selektivně usmrcují buňky zhoubného bujení, buněčný test inhibitorů MetAP-2 může vést k objevení nových léků určených proti zhoubnému bujení. Proto se při testování inhibitorů MetAP-2 v endoteliálních buňkách použily buněčné permeabilní fluorogenní nebo fluorescenční substráty vhodné pro MetAP-2, což mohlo vést k vývoji nových činidle proti zhoubnému bujení.

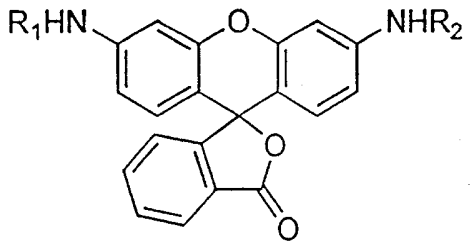
Ukázalo se, že proteázové inhibitory HIV, jako je ritonavir a viracept, jsou velmi účinné při léčbě pacientů infikovaných HIV. Tyto inhibitory se vytvořily na základě struktury HIV proteázového substrátu. Aktivita těchto inhibitorů se nejdříve stanovila proti proteázám HIV. U aktivních látek se pak testovala schopnost inhibovat HIV infekci v buněčné kultuře. Buněčný permeabilní fluorogenní nebo fluorescenční substrát proteázy HIV se mohl použít při testování inhibitorů proteáz HIV v buňkách infikovaných HIV, což by mohlo urychlit proces objevení nových inhibitorů proteáz HIV a vésti k lepší a účinnější léčbě infekce HIV. Protože HIV proteázy zpracovávají virové prekurzorové proteiny v pozdní fázi při virové replikaci, může se také při testování látek, které inhibují transkripci nebo translaci genů, vstup virů nebo jiných klíčových proteinů v časné fázi infekce HIV, použít buněčný permeabilní fluorogenní nebo fluorescenční substrát proteáz HIV. Fluorogenní nebo fluorescenční substráty se mohou také použít pro diagnózu infekce HIV, která může být citlivější než současně dostupné metody.

Aplikací stejného principu se mohou použít buněčné permeabilní fluorogenní nebo fluorescenční substráty pro katepsin B při testování inhibitorů katepsinu B. Buněčné permeabilní fluorogenní nebo fluorescenční substráty pro dipeptidyl-peptidázu IV se mohou použít při testování

12.06.00

inhibitorů dipeptidyl-peptidázy IV. Buněčné permeabilní fluorogenní nebo fluorescenční substráty vhodné pro renin se mohou použít při testování inhibitorů reninu. Buněčné permeabilní fluorogenní nebo fluorescenční substráty pro adeninovou proteázu nebo jiné virové proteázy se mohou použít k testování inhibitorů adenovirových proteáz nebo jiných virových proteáz.

US patenty č. 4,557,862 a 4,640,893 popisují deriváty rodaminu 110, které slouží jako fluorogenní substráty vhodné pro proteinázy obecného vzorce:



kde symboly R_1 a R_2, které jsou stejné nebo odlišné, se vybraly ze skupiny zahrnující aminokyseliny, aminokyselinové deriváty, chráněné aminokyseliny, chráněné aminokyselinové deriváty a peptidy. Příklady $(AA)_2$-rodaminů a $(peptid)_2$-rodaminů jsou $(Z\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Ala\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}GlN\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Glu\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Gly\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Leu\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Met\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Phe\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Pro\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Trp\text{-}Arg)_2$-rodamin 110, $(Z\text{-}Val\text{-}Arg)_2$-rodamin 110 a $(Z\text{-}Ile\text{-}Pro\text{-}Arg)_2$-rodamin 110.

V dokumentu WO 96/36729 se popisují látky nebo jejich sole pro testování aktivity enzymu uvnitř metabolicky aktivní celé buňky. Uvádí se, že testovaná látka obsahuje odstupující skupinu a indikátorovou skupinu. Odstupující skupina se vybrala se skupiny zahrnující aminokyseliny, peptidy, sacharidy, sírany, fosforečnany, estery, fosfátované estery,

12.06.00

nukleotidy, polynukleotidy, nukleové kyseliny, pyrimidiny, puriny, nukleozidy, lipody nebo směsi. Indikátorová skupina se vybrala ze skupiny zahrnující látky, které jsou v první fázi spojeny s odstupující skupinou a ve druhém stádiu se odstupující skupina odštěpí z indikátorové skupiny enzymem. Preferované indikátorové skupiny jsou rodamin 110, rodol a fluorescein a analogy těchto skupin. V patentových dokumentech se uvádí řada enzymů a substrátů enzymů.

V dokumentu US patent 5,576,424 se popisují haloalkylové deriváty reportních molekul používaných při analýze metabolické aktivity v buňkách obecného vzorce:

XR-SPACER-REPORTER-BLOK

Kde -BLOK je skupina vybraná tak, aby byla odstranitelná působením specifického analytu za vzniku reportních spektrálních vlastností, které se liší od vlastností substrátu. -REPORTER- je molekula, která, když není vázaná na BLOK vazbou BLOK-REPORTER-, má spektrální vlastnosti odlišné od vlastností substrátu, -SPACER- je kovalentní spojení a XR- je haloalkylová část, která může kovalentně reagovat s vnitrobuněčným thiolem za vzniku thioeterového konjugátu. Preferované reportní látky zahrnují rodamin-110, rodol, fluorescein a jiné.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje fluorogenní nebo fluorescenční látky obecného vzorce I:

x-y-z (I)

nebo biologicky přijatelné sole nebo jeho pro-reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsaženého aminokyselinových zbytcích), kde symbol x a z jsou stejné nebo odlišné a tvoří je peptid nebo aminokyselina nebo acylová skupina nebo jiná struktura tak, že látka obecného vzorce I

12.06.00

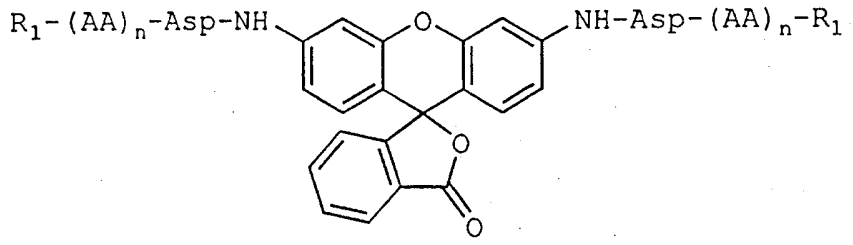
slouží jako substrát pro kaspázy nebo substrát pro jiné proteázy nebo peptidázy nebo jiné enzymy; a kde štěpitelnou vazbou je pouze jedna nebo obě vazby x-y a y-z látky obecného vzorce I v případě, že symbol x je stejný jako z nebo, když štěpitelnou vazbou je pouze jedna vazba x-y nebo y-z látky obecného vzorce I, kdy x se liší od z. y je fluorogenní nebo fluorescenční část.

Preferovanou látku popisuje obecný vzorec II:

$$R_1\text{-}(AA)_n\text{-Asp-y-Asp-}(AA)_n\text{-}R_1 \qquad \text{(II)}$$

nebo její biologicky přijatelné sole nebo pro-reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích), kde R_1 je skupina chránící N-konec, jako je t-butyloxykarbonyl, acetyl a benzyloxykarbonyl. Každé AA nezávisle znázorňuje zbytek libovolné přirozené nebo nepřirozené α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny nebo deriváty α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny, přičemž každý symbol n má nezávisle hodnotu 0 až 5 a symbol y je fluorogenní nebo fluorescenční část. Preferuje se, když y je rodamin zahrnující rodamin 110, rodamin 116 a rodamin 19. Nejvíce se preferuje, když y je rodamin 110.

Zvláště preferované látky reprezentuje obecný vzorec III:



(III

nebo její biologicky přijatelné sole nebo reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsaženého v aminokyselinových zbytcích), kde R_1, AA, n jsou definovány shora v textu v obecném vzorci II. Preferovaným R_1 je t-

12.06.00

butyloxykarbonyl, acyl a benzyloxykarbonyl. Preferované hodnoty symbolu n jsou 1 až 3.

Vynález se také týká způsobu přípravy látky obecného vzorce III, který zahrnuje

(a) kondenzaci rodaminu s β-t-butylesterem kyseliny *N*-fmoc-L-aspartové za vzniku $(Fmoc\text{-}Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu,

(b) odstranění skupiny Fmoc za vzniku $Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu,

(c) kondenzaci $Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu s $Z\text{-}(AA)_n$ za vzniku $(Z\text{-}(AA)_n\text{-}Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu a

(d) odstranění chránící skupiny OBu-t.

V preferovaném provedení vynálezu $-(AA)_n$ je WEH SEQ ID NO: 1, YVA SEQ ID NO: 2, LEH SEQ ID NO: 3, DET SEQ ID NO: 4, DEV SEQ ID NO: 5, DEH SEQ ID NO: 6, VEH SEQ ID NO: 7, LET SEQ ID NO: 8, LEV SEQ ID NO: 9, SHV SEQ ID NO: 10, DEL SEQ ID NO: 11, DGP SEQ ID NO: 12, DEP SEQ ID NO: 13, DGT SEQ ID NO: 14, DLN SEQ ID NO: 15, DEE SEQ ID NO: 16, DSL SEQ ID NO: 17, DVP SEQ ID NO: 18, DEA SEQ ID NO: 19, DSY SEQ ID NO: 20, ELP SEQ ID NO: 21, VED SEQ ID NO: 22, IEP SEQ ID NO: 23 nebo IET SEQ ID NO: 24. Karboxyskupiny, které obsahují aminokyseliny jsou chráněny skupinou OBu-t, která se v konečném kroku odstraní.

Vynález dále popisuje jinou skupinu preferovaných látek obecného vzorce I , které zahrnují látky, kde x není stejné jako z. Preferované látky této skupiny zahrnují ty, kde x je peptid nebo jiná struktura, která činí tuto látku vhodnou jako substrát pro kaspázy nebo jako substrát pro jiné proteázy nebo peptidázy nebo jiné enzymy. Vazba x-y je vazba štěpitelná za biologických podmínek. Symbol z představuje chránící skupinu a vazba y-z v obecném vzorci I není štěpitelná za biologických podmínek.

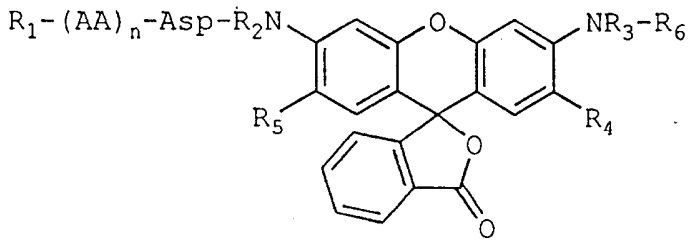
Popisují se nové fluorogenní nebo fluorescenční reportní látky podle vynálezu obecného vzorce V:

$$R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp\text{-}y\text{-}R_6 \qquad (V)$$

12.06.00

nebo její biologicky přijatelné sole nebo pro-reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsaženého v aminokyselinových zbytcích), kde R_1, AA, n a y jsou definovány shora v textu v obecném vzorci II a R_6 je chránící skupina, která není aminokyselinou nebo derivátem aminokyseliny.

Zvláště preferovaným provedením látek obecného vzorce V jsou látky obecného vzorce VII:



VII

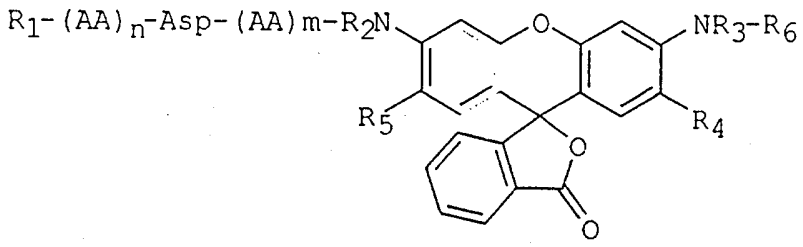
nebo její biologicky přijatelné sole nebo reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích),

kde R_1, R_6, AA a n jsou definovány shora v textu v obecném vzorci II a V.

R_2 a R_3 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

R_4 a R_5 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík nebo alkyl.

Vynález popisuje jinou skupinu preferovaného provedení látek obecného vzorce I, které reprezentuje obecný vzorec VIII:



VIII

12.06.00

nebo její biologicky přijatelné sole nebo pro-reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích),

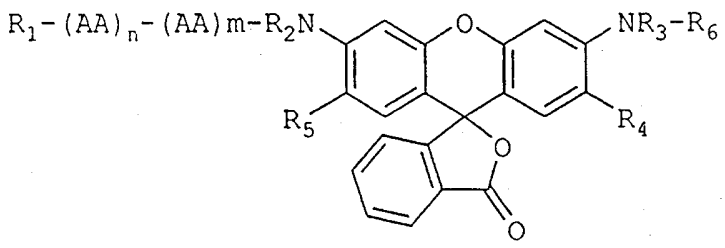
kde R_1, R_6, AA a n jsou definovány shora v textu v obecném vzorci II a V,

m představuje celé číslo od 0 do 3,

R_2 a R_3 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

R_4 a R_5 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík nebo alkyl.

Vynález popisuje jinou skupinu preferovaného provedení látek obecného vzorce I, které reprezentuje obecný vzorec IX:



IX

nebo její biologicky přijatelné sole nebo reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích),

kde R_1, R_6, AA a n jsou definovány shora v textu v obecném vzorci II a V,

m představuje celé číslo od 0 do 3,

R_2 a R_3 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

R_4 a R_5 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík nebo alkyl.

Vynález dále popisuje způsob přípravy látky obecného vzorce VII, který zahrnuje:

12.06.00

(a) reakcí rodaminu s anhydridem kyseliny octové za vzniku *N*-acetyl-rodaminu obecného vzorce VI,

(b) kondenzaci *N*-acetyl-rodaminu obecného vzorce VI s β-t-butylesterem kyseliny *N*-fmoc-L-aspartové za vzniku *N*-(Fmoc-Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu,

(c) odstranění skupiny Fmoc za vzniku *N*-(Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu,

(d) kondenzace *N*-(Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu s Z-$(AA)_n$ za vzniku *N*-(Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu a

(e) odstranění chránící skupiny OBu-t za vzniku *N*-(Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu

nebo v jiném případě

(a) reakcí rodaminu s anhydridem kyseliny octové za vzniku *N*-acetyl-rodaminu obecného vzorce VI,

(b) kondenzaci *N*-acetyl-rodaminu obecného vzorce VI s Z-$(AA)_n$-Asp(β-OBu-t) za vzniku *N*-(Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu a

(c) odstranění chránící skupiny OBu-t za vzniku *N*-(Z-$(AA)_n$-Asp)-*N´*-acetyl-rodaminu.

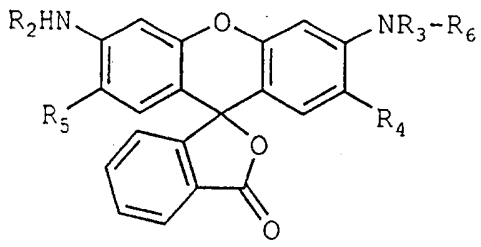
V tomto provedení vynálezu, kde $(AA)_n$ zahrnuje aminokyseliny, jako je kyselina glutamová nebo aspartová, je karboxylová skupina chráněna skupinou OBu-t, která se odštěpí při posledním kroku.

Vynález také popisuje nová fluorescenční barviva obecného vzorce VI, které jsou deriváty rodaminů. Tyto látky se připravují zavedením chránící skupiny R_6 do jedné nebo dvou aminokyselinových skupin rodaminu. Skupina R_2NH v obecném vzorci VI poskytuje místo připojení pro reakci s potenciálním substrátem enzymu, jako je karboxylová skupina peptidu s chráněným N-koncem za vzniku peptid-amidové vazby. Reakce převede fluorescenční molekulu obecného vzorce VI na nefluorescenční peptidovou reportní molekulu obecného vzorce VII-IX, které slouží jako substrát pro proteázu a peptidázu.

12.06.00

Štěpením štěpitelné amidové vazby v molekule peptid-reporter proteázami nebo peptidázami vzniká látka obecného vzorce VI nebo VI´, která je fluorescenční.

Vynález popisuje nové fluorescenční barviva podle vynálezu obecného vzorce VI:



VI

nebo biologicky přijatelné sole, kde

R_2 a R_3 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

R_6 představuje chránící skupinu, která není aminokyselinou nebo derivátem aminokyseliny,

R_4 a R_5 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík nebo alkyl skupinu.

R_2 a R_3 s výhodou představují vodík, metyl nebo etyl. R_4 a R_5 s výhodou představují vodík nebo metyl.

Vynález se dále vztahuje ke způsobu použití reportních látek obecného vzorce I, za účelem měření aktivity vnitrobuněčných kaspáz nebo jiných enzymů, které se účastní apoptázy v živých nebo mrtvých celých buňkách nebo v tkáni. Vynález se dále týká způsobů použití látek obecného vzorce I a zde popsaných testů vhodných pro měření aktivace nebo inhibice libovolných kaspázových enzymů uvnitř libovolné živé nebo mrtvé celé buňky nebo tkáně (normální nebo karcinogenní) pomocí testovací látky nebo látek. Látky obecného vzorce I jsou permeabilní. Mohou se tedy zavést do celých buněk nebo vzorků tkání. Látky jsou fluorogenní nebo fluorescenční a mohou se vytvořit tak, aby byly specifické pro libovolný známý

12.06.00

enzym kaspáza nebo pro libovolné jiné vnitrobuněčné enzymy, které se účastní apoptózy.

V publikaci Thornberry, N. A., et al., J. Biol. Chem. 272: 17907 (1997) se popisují optimální sekvence různých kaspázových substrátů a substrátu granzymu B. Optimální substrátové sekvence jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1

Enzym*	Optimální sekvence**
Kaspáza-1 (ICE)	WEHD SEQ ID NO: 1
Kaspáza-2 (ICH-1, mNEDD2)	DEHD SEQ ID NO: 6
Kaspáza-3 (apopain, CPP-32, YAMA)	DEVD SEQ ID NO: 5
Kaspáza-4 (ICE_{rel}-II, TX, ICH-2)	(W/L)EHD SEQ ID NO: 25
Kaspáza-5 (ICE_{rel}-III, TY)	(W/L)EHD SEQ ID NO: 25
Kaspáza-6 (Mch2)	VEHD SEQ ID NO: 7
Kaspáza-7 (Mch3, ICE-LAP3, CMH-1)	DEVD SEQ ID NO: 5
Kaspáza-8 (MACH, FLICE, Mch5)	LETD SEQ ID NO: 8
Kaspáza-9 (ICE-LAP6, Mch6)	LEHD SEQ ID NO: 3
Granzym B	IEPD SEQ ID NO: 23

*enzymy jsou označeny starým (v závorkách) a novým názvoslovím

**Pro označení optimálních aminokyselinových sekvencí se používají standardní jednopísmenné zkratky.

Za použití optimálních sekvencí popsaných v publikaci Thornberry, N. A., et al., Nature, 356: 768 (1992) se mohou syntetizovat fluorogenní nebo fluorescenční substráty vhodné pro specifické kaspázy podle zde popsaného postupu.

Je také možné vytvořit další jiné fluorogenní a fluorescenční substráty, které jsou vhodné pro známé nebo neznámé kaspázy, použitím známých nebo potencionálních sekvencí tvořících místa štěpení peptidu ze známých nebo

12.06.00

potencionálních přirozených substrátů enzymů kaspáz. Tabulka č. 2 znázorňuje peptidové sekvence odpovídající známým nebo potencionálním místům štěpení v proteinech, které mohou být přirozenými substráty kaspáz.

Tabulka č. 2:

Enzym	Substrát	Sekvence štěpení*
Kaspáza-3	PARP	DEVD SEQ ID NO: 5
	PAK2	SHVD SEQ ID NO: 10
	D4-GDI	DELD SEQ ID NO: 11
	U1-70kDa	DGPD SEQ ID NO: 12
	SREBP	DEPD SEQ ID NO: 13
	DNA-PK	DEVD SEQ ID NO: 5
	Huntingtin	DGTD SEQ ID NO: 14 DLND SEQ ID NO: 15 DEED SEQ ID NO: 16 DSLD SEQ ID NO: 17
	mdm2	DVPD SEQ ID NO: 18
Kaspáza-3 a jiné neznámé kaspázy	Fodrin	DETD SEQ ID NO: 4
Pravděpodobná kaspáza-3	Rb	DEAD SEQ ID NO: 19
Pravděpodobná kaspáza-3	Preseniliny	DSYD SEQ ID NO: 21
?	Aktin	ELPD SEQ ID NO: 21
Kaspáza-6	Lamin A	VEID SEQ ID NO: 26
Kaspáza-8	CPP32	IETD SEQ ID NO: 24

* Pro označení aminokyselinových sekvencí se použily standardní jednopísmenné zkratky aminokyselin.

Fluorogenní nebo fluorescenční substráty se mohou také vytvořit za účelem měření více než jednoho enzymu ve stejném okamžiku. Vytvoří se substráty, které jsou rozeznávány a štěpeny více než jedním enzymem, který se účastní kaspázové

12.06.00

kaskády. Fluorogenní nebo fluorescenční substráty, které využívá více jak jedna kaspáza, se mohou použít ve zde popsaném testu pro měření aktivity zatím neznámých kaspáz.

Když se kaspázová kaskáda aktivuje stimulem vyvolávající úmrtí buňky, popsané fluorogenní nebo fluorescenční reportní molekuly se štěpí, přičemž dochází k velkému nárůstu fluorescenčního záření. Změny v intenzitě fluorescenčního záření je možné měřit spektrofluorimetricky. Reportní molekuly je také možné využít k měření základní aktivity kaspáz v buňkách, které nepodléhají apoptóze. Tento způsob je možné adaptovat na testy s vysokou průchodností nebo s ultra-vysokou průchodností.

Testovací systém je univerzální. Příklady extrémní flexibility testovacího systému se popisují dále v textu:

1. test je možné použít při testování základní aktivity libovolného enzymu kaspázy nebo libovolného jiného enzymu účastnící se apoptózy v buňce nebo v tkáni.
2. Test se může použít k testování látek, které mohou buď aktivovat nebo inhibovat kaspázovou kaskádu. To znamená, že test se může použít při hledání léků proti degenerativním onemocněním nebo léků proti zhoubnému bujení.
3. Test je možné použít při testování aktivace nebo inhibice kaspázové kaskády v libovolných živých nebo mrtvých buňkách nebo buněčných liniích získaných z orgánového systému těla, který zahrnuje, ale neomezuje se na vlasy, mozek, periferní nervový systém, oči, uši, nos, ústa, mandle, zuby, jícen, plíce, srdce, krev, žíly, kostní dřeň, lymfatické žlázy, brzlík, slezina, imunitní systém, játra, žaludek, intestinální trakt, pankreas, žlázy s vnitřní sekrecí a tkáně, ledviny, močový měchýř, reprodukční orgány a žlázy, klouby, kosti a kůže. Test se může použít při testování léků s potencionálním použitím

12.06.00

při libovolném onemocnění libovolného orgánového systému v těle, kde se vykazuje porucha kaspázové kaskády.

4. Test se může použít při testování léků, které mohou upravit kaspázovou kaskádu přímo nebo nepřímo. To znamená modulací samotných kaspáz nebo modulací buněčných receptorů a ko-faktorů, které ovlivňují kaspázovou kaskádu.
5. Test se může použít při stanovení místa působení, ve kterém modulátor interferuje. To znamená, že test může pomoci odhalit molekulární mechanizmy působení nových léků, které slouží jako modulátory kaspázové kaskády.

Vynález se také vztahuje k použití fluorogenních nebo fluorescenčních substrátů obecného vzorce I vhodných pro nalezení nových látek nebo nových použití známých látek při redukci nebo léčbě chorob, při kterých odumírání buněk je kauzativní faktor nebo výsledek. Příklady použití podle vynálezu zahrnuje testování látek, které mohou chránit nervový systém následující ložiskovou a globální ischemii; testování látek, které mohou léčit neurodegenerativní poruchy, jako je Alzheimerova nemoc, Huntingtonova nemoc, Parkinsonova nemoc, roztroušená skleróza, amyotrofní laterální skleróza, ataxie, teleangiektazie a spinobulbární atrofie; testování látek, které mohou léčit onemocnění srdce zahrnující infarkt myokardu, městnavé srdeční selhání a kardiomyopatie; testování látek, které se mohou použít při léčbě poškození sítnice; testování látek, které se mohou použít při léčbě poruch autoimunity, které zahrnují lupus erythematodes, revmatoidní artritida, cukrovku typu I, Sjogrenův syndrom a glomerulonefritidu; testování látek, které se mohou použít pro léčbu polycystického onemocnění ledvin a anemie/erytropoézy; testování látek, které se používají při léčbě poruch imunitního systému zahrnující AIDS a SCIDS; testování látek, které omezují nebo brání poškození buňky, tkáně a orgánu během

12.06.00

transplantace (například štěp versus onemocnění hostitele při procesu transplantace kostní dřeně); testování látek, které omezují nebo brání odumírání buněk buněčné linie v průmyslové biotechnologii; testování látek, které omezují nebo brání vzniku alopecie (ztráta vlasů) a testování látek, které redukují odumírání nedozrálých buněk kůže.

Vynález se také týká použití fluorogenních nebo fluorescenčních substrátů obecného vzorce I v testovacím postupu, kde se testují známé léky nebo kombinační nebo jiné knihovny látek, přičemž se vyhledávají látky s protinádorovou aktivitou nebo s aktivitou proti zhoubnému bujení. Buňky zhoubného bujení nebo buněčné linie je možné získat z libovolného zhoubného bujení libovolného vnitřního nebo vnějšího orgánového systému v těle. Tento orgánový systém zahrnuje, ale není omezen na mozek, priferní nervový systém, oči, uši, nos, ústa, mandle, zuby, jícen, plíce, srdce, krev, cévy, kostní dřeň, lymfatické žlázy, brzlík, slezina, imunitní systém, játra, žaludek, intestinální trakt, pankreas, žlázy s vnitřní sekrecí a tkáně, ledviny, močový měchýř, reprodukční orgány a žlázy (například prostata), klouby, kosti a kůže.

Vynález také popisuje použití fluorogenních nebo fluorescenčních substrátů obecného vzorce I při diagnostických postupech za účelem stanovení chemosenzitivity nebo rezistence buněk zhoubného bujení odebraných ze zvířat, které se budou léčit chemoterapeutickými léky. Buňky zhoubného bujení nebo buněčné linie se mohou získat z libovolného zhoubného bujení libovolného vnitřního nebo externího orgánového systému v těle, který zahrnuje, ale není omezen na mozek, periferní nervový systém, oči, uši, nos, ústa, mandle, zuby, jícen, plíce, srdce, krev, cévy, kostní dřeň, lymfatické žlázy, brzlík, slezina, imunitní systém, játra, žaludek, intestinální trakt, pankreas, žlázy s vnitřní sekrecí a tkáně, ledviny, močový měchýř, reprodukční orgány a žlázy (například prostata), klouby, kosti a kůže.

12.06.00

Vynález se dále týká způsobu detekce enzymu, který se účastní apoptózové kaskády v jedné nebo více buňkách a který zahrnuje:

a) kontakt jedné nebo více buněk s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy reportní látka je pohlcena jednou nebo více buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedené jedné nebo více buněk, kde změna fluorescence, to znamená hodnoty fluorescence (růst) nebo vlnové délky, v jedné nebo více buňkách v porovnání s kontrolními buňkami, které nepřišly do kontaktu s reportní látkou a se známým kompetetivním inhibitorem enzymu, je indikace přítomnosti enzymu.

Vynález také popisuje způsob měření aktivity enzymu, který se účastní apoptózové kaskády v jedné nebo více buňkách, který zahrnuje:

a) kontakt jedné nebo více buněk s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, při kterých uvedená reportní látka je pohlcena jednou nebo více buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence jedné nebo více buněk, kde relativní změna fluorescence v jedné nebo více buňkách v porovnání s kontrolními buňkami, které nepřišly do kontaktu s reportní látkou a se známým kompetitivním inhibitorem enzymu, je mírou aktivity enzymu.

Vynález se týká způsobu stanovení, zda testovaná látka působí na enzym, který se účastní apoptózové kaskády v jednom nebo více testovaných buněk, který zahrnuje:

(a) kontakt jedné nebo více testovaných buněk s testovanou látkou a reportní látkou podle vynálezu za podmínek, při kterých uvedená reportní látka je pohlcena jednou nebo více buňkami a testovaná látka buď interaguje s externím membránovým receptorem nebo je pohlcena buňkou a

12.06.00

(b) zaznamenávání fluorescence testovaných buněk, kde změna fluorescence, buď hodnoty fluorescence nebo vlnové délky buňkách, v porovnání s kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu s reportní látkou a nikoli s testovanou látkou, je indikace, že testovaná látka má přímý nebo nepřímý účinek na testovaný apoptózový enzym.

Testované buňky mohou přijít do kontaktu s uvedenou testovanou látkou před tím, než přišly do kontaktu s reportní látkou, po nebo současně s ní. Způsob se může použít ke stanovení, zda testovaná látka stimuluje nebo inhibuje aktivitu enzymu.

V preferovaném provedení vynálezu, testovaná buňka je buňkou zhoubného bujení nebo buněčné linie získané z člověka, který potřebuje léčbu chemoterapeutickým lékem a testovaná látka je chemoterapeutické činidlo nebo směs chemoterapeutických činidel.

Vynález se také vztahuje k metodě stanovení citlivosti zvířete se zhoubným bujením, aby se mohlo léčit jedním nebo více chemoterapeutickými činidly. Tento způsob zahrnuje:

a) kontakt buněk zhoubného bujení odebraných z uvedených zvířat s jedním nebo více chemoterapeutických činidel a reportní látkou podle vynálezu za podmínek, při kterých reportní látka je pohlcena buňkami zhoubného bujení, přičemž jedna nebo více léků buď interagují s externím mebránovým receptorem nebo jsou pohlceny uvedenou buňkou a

b) zaznamenávání fluorescence buněk zhoubného bujení, kde změna fluorescence, buď hodnota nebo vlnová délka, u buněk zhoubného bujení ve srovnání s kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu pouze s reportní látkou, je indikace, že rakovinové buňky jsou chemosenzitivní vůči jednomu nebo více činidlům a že zvíře je citlivé na léčbu.

12.06.00

Vynález se také vztahuje ke způsobu monitorování léčby zvířete jedním nebo více chemoterapeutických léků. Tento způsob zahrnuje:

a) aplikaci jednoho nebo více chemoterapeutických léků zvířeti,

b) kontakt buněk získaných ze zvířete po aplikaci reportní látky podle vynálezu za podmínek, kdy reportní látka je pohlcena buňkami a

c) zaznamenávání fluorescence buněk, které přišly do kontaktu s reportní látkou, kde změna fluorescence, buď její hodnota nebo vlnová délka, v buňkách odebraných zvířeti po aplikaci ve srovnání s kontrolními buňkami, které se odebraly zvířeti před aplikací indikuje, že zvíře je citlivé vůči chemoterapeutickému činidlu. V tomto provedení vynálezu zvíře může trpět nemocí, kde apoptické odumírání buněk je buď kauzativní faktor nebo je to výsledek onemocnění.

Vynález se také vztahuje ke způsobu stanovení, zda testovaná látka inhibuje nebo brání odumíraní buněk v případě jedné nebo více testovaných buněk. Tento způsob zahrnuje:

a) kontakt testované buňky s testovanou látkou a s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy testovaná látka buď interaguje s externím membránovým receptorem nebo je buňkou pohlcována a reportní látka je buňkou pohlcena a

b) zaznamenávání fluorescence testovaných buněk, kde změna fluorescence, buď její hodnota nebo vlnová délka, v testovaných buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu pouze s reportní látkou indikuje, že testovaná látka inhibuje nebo brání odumírání buněk.

12.06.00

Vynález dále popisuje způsob stanovení, zda testovaná látka způsobuje nebo zesiluje odumírání buněk v jedné nebo více testovaných buňkách. Tento test zahrnuje:

a) kontakt testovaných buněk s testovanou látkou a reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy testovaná látka interaguje s externím membránovým receptorem nebo je pohlcována buňkami. Reportní látka je pohlcována buňkami.

b) zaznamenávání fluorescence testovaných buněk, kde změna fluorescence, buď její hodnoty nebo vlnové délky, v testovaných buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu pouze s reportní látkou, indikuje, že testovaná látka způsobuje nebo zesiluje odumírání buněk.

Vynález se také vztahuje ke způsobu použití reportních látek obecného vzorce IX za účelem měření aktivity vnitrobuněčných peptidáz a proteáz v živých celých buňkách. Tyto látky zahrnují, ale nejsou omezeny na aminopeptidázu methioninu typ 2 v endoteliálních buňkách a HIV proteázu v buňkách infikovaných HIV. Vynález se také týká způsobů použití látek obecného vzorce IX a zde popsaných způsobů testování vhodných pro měření inhibice nebo aktivace enzymů uvnitř živých celých buněk pomocí testované látky nebo látek. Reportní látky obecného vzorce IX jsou permeabilní, což znamená, že mohou vstoupit do celých buněk. Látky jsou fluorogenní nebo fluorescenční a mohou se vytvořit tak, že jsou specifické pro známé enzymy, jako je aminopeptidáza methioninu nebo proteáza HIV.

Vynález se také týká způsobu detekce virové proteázy v jedné nebo více buňkách. Tento způsob zahrnuje:

a) kontakt buněk s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy reportní látka vstupuje do buněk a

b) zaznamenávání fluorescence uvedených buněk, kde změna nebo zvýšení fluorescence v buňkách ve srovnání

s kontrolními buňkami, které nepřišly do kontaktu s reportní látkou indikuje přítomnost virové proteázy.

Vynález se také vztahuje ke způsobu měření aktivity virové proteázy v jedné nebo více infikovaných buňkách, který zahrnuje:

a) kontakt jedné nebo více virových infikovaných buněk s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy reportní látka je pohlcena jednou nebo více virem infikovanými buňkami a

b) zaznamenání fluorescence uvedené jedné nebo více buněk, kde změna nebo zvýšení fluorescence v jedné nebo více buňkách infikovaných virem ve srovnání s kontrolními buňkami, které nepřišly do kontaktu s reportní látkou indikuje míru aktivity virové proteázy.

Vynález dále popisuje způsob stanovení, zda testovaná látka působí na aktivitu virové proteázy v jedné nebo více virem infiovaných buněk, který zahrnuje:

a) kontakt virových infikovaných testovaných buněk s testovanou látkou podle vynálezu za podmínek, kdy uvedená reportní látka je pohlcena jednou nebo více infikovaných buněk a

b) zaznamenání fluorescence uvedených testovaných buněk ve srovnání s kontrolními buňkami, které nepřišly do kontaktu s reportní látkou, kde změna nebo zvýšení fluorescence v infikovaných testovaných buňkách ve srovnání s infikovanými kontrolními buňkami indikuje, že testované substance mají účinek na virovou proteázu.

V preferovaném provedení vynálezu buňkami jsou buňky infikované HIV a virová proteáza je HIV proteáza. V jiném preferovaném provedení vynálezu buňky jsou buňky infikované adenovirem a virová proteáza je adenovirová proteáza. V jiném preferovaném provedení vynálezu buňky jsou buňky infikované

HSV a virová proteáza je HSV proteáza. V jiném preferovaném provedení vynálezu buňky jsou buňky infikované HCMV a virová proteáza je proteáza HCMV. V jiném preferovaném provedení vynálezu buňky jsou buňky infikované HCV a virová proteáza je proteáza HCV.

Vynález popisuje způsob měření aktivity proteázy nebo peptidázy v buňkách, který zahrnuje:

a) kontakt testovaných buněk s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy uvedená reportní látka je pohlcena testovanými buňkami a

b) zaznamenání fluorescence uvedených buněk ve srovnání s kontrolními buňkami, které nepřišly do kontaktu s reportní látkou, kde změna nebo zvýšení fluorescence v testované buňce je míra aktivity proteáz nebo peptidáz.

Vynález se také týká způsobu stanovení, zda testovaná látka má účinek na aktivitu proteázy nebo peptidázy v testovaných buňkách, který zahrnuje:

a) kontakt testovaných buněk s testovanou látkou a reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy reportní látka vstupuje do testovaných buněk nebo reportní látka interaguje s externí membránovou proteázou nebo peptidázou buněk a

b) zaznamenávání fluorescence testovaných buněk ve srovnání s kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu pouze s reportní látkou, kde změna nebo zvýšení fluorescence v testovaných buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami indikuje, že testovaná látka má účinek na proteázu nebo peptidázu.

V preferovaném provedení vynálezu buňky jsou endoteliální buňky a peptidáza je aminopeptidáza metioninu typ 2. V jiném preferovaném provedení vynálezu buňky jsou T buňky a peptidáza je dipeptidylpeptidáza IV. V jiném preferovaném provedení vynálezu buňky jsou neuronové buňky a proteáza je kalpain.

12.06.00

Fluorogenní nebo fluorescenční substráty podle vynálezu jsou látky obecného vzorce I:

x-y-z (I)

nebo biologicky přijatelné sole nebo jeho pro-reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích), kde symboly x a z jsou stejné nebo odlišné a tvoří je peptid nebo aminokyselina nebo acyl nebo jiná struktura tak, že látka obecného vzorce I slouží jako substrát pro kaspázy nebo pro jiné proteázy nebo peptidázy nebo jiné enzymy. Štěpitelnou vazbou je pouze jedna nebo obě vazby x-y a y-z látky obecného vzorce I, v případě, že symbol x je stejný jako z nebo když štěpitelnou vazbou je pouze jedna vazba x-y nebo y-z látky obecného vzorce I, kdy x se liší od z. y je fluorogenní nebo fluorescenční část.

Preferované látky, které vynález popisuje zahrnují látky, kde symbol x je stejný jako z a první aminokyselina připojená k y je Asp. Upřednostňuje se, aby x bylo stejné jako z a představuje tetrapeptidový substrát kaspázy s chráněným N-koncem zahrnující WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, SHVD SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO: 21, VEID SEQ ID NO: 26, IETD SEQ ID NO: 24 nebo tetrapeptidový substrát granzymu B s chráněným N-koncem zahrnující IEPD SEQ ID NO: 23 a VEPD SEQ ID NO: 27 nebo symbol x je stejný jako z a představuje peptid s chráněným N-koncem, který odpovídá karboxyterminálnímu nebo aminoterminálnímu fragmentu, který zahrnuje 1, 2 nebo 3 aminokyseliny tetrapeptidového substrátu kaspázy zahrnující WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ

12.06.00

ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, SHVD SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO: 21, VEID SEQ ID NO: 26, IETD SEQ ID NO: 24 a granzym B zahrnující IEPD SEQ ID NO: 23 a VEPD SEQ ID NO: 27.

Vynález dále popisuje preferované látky obecného vzorce I zahrnující látky, kde symbol y představuje rodamin 110.

Zvláště preferovaným provedením látek obecného vzorce I jsou látky obecného vzorce II:

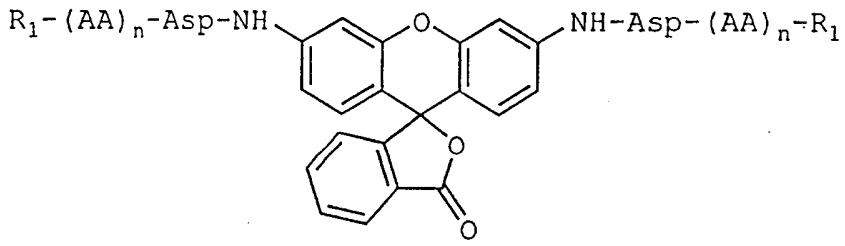
$$R_1\text{-}(AA)_n\text{-Asp-y-Asp-}(AA)_n\text{-}R_1 \qquad (II)$$

nebo její biologicky přijatelné sole nebo reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích), kde R_1 je skupina chránící N-konec, jako je t-butyloxykarbonyl, acetyl a benzyloxykarbonyl. Každé AA nezávisle znázorňuje zbytek libovolné přirozené nebo nepřirozené α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny nebo deriváty α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny. Každý symbol n má nezávisle hodnotu 0 až 5 a symbol y je fluorogenní nebo fluorescenční část. Příkladem pro-reportní molekuly jsou látky obecného vzorce II zahrnující aminokyselinové zbytky obsahující metylesterovou formu karboxylu. Jiným příkladem pro-reportní molekuly jsou látky obecného vzorce II zahrnující aminokyselinové zbytky obsahující acetoxymetylesterovou formu karboxylu (AM-estery). Je známo, že látky obsahující AM-estery karboxylu, procházejí buněčnou stěnou a mohou se uvnitř buněk hydrolyzovat esterázami. Po té, co se hydrolyzují, látky obsahující kraboxyl se stávají neprůchodnými buněčnou membránou a jsou uzavřeny uvnitř buněk (popisuje se v publikaci Adams et al., J. Am. Chem. Soc. 111: 7957-7968

12.06.00

(1989)). AM-estery se mohou připravit reakcí odpovídajících látek obsahujících karboxyskupinu s brommetylacetátem.

Zvláště preferované provedení látek obecného vzorce I jsou látky obecného vzorce III:



(III

nebo její biologicky přijatelné sole nebo reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích), kde R_1, AA, n jsou definovány shora v textu v obecném vzorci II. Preferovaným R_1 je t-butyloxykarbonyl, acetyl a benzyloxykarbonyl. Preferované hodnoty symbolu n jsou 1 až 3.

Preferované látky, které vynález popisuje, spadají mezi látky obecného vzorce I, kde symbol x není stejný jako z. Preferované látky této skupiny zahrnují ty, kde symbol x představuje peptid nebo jinou strukturu, která činí látku použitelnou jako substrát kaspáz nebo jiných proteáz nebo peptidáz nebo jiných enzymů. Vazba x-y v obecném vzorci I je štěpitelná za biologických podmínek. Symbol x představuje chránící skupinu a vazba y-z obecného vzorce I není štěpitelná za biologických podmínek. Nejvíce se upřednostňuje, aby symbol x představoval tetrapetidový substrát kaspáz s chráněným N-koncem zahrnující WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, SHVD SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO:

12.06.00

21, VEID SEQ ID NO: 26, IETD SEQ ID NO: 24 nebo tetrapeptidový substrát granzymu B s chráněným N-koncem zahrnující IEPD SEQ ID NO: 23 a VEPD SEQ ID NO: 27. Symbol x představuje peptid s chráněným N-koncem, který odpovídá karboxyterminálnímu nebo aminoterminálnímu fragmentu, který zahrnuje 1, 2 nebo 3 aminokyseliny tetrapeptidového substrátu kaspázy zahrnující WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, SHVD SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO: 21, VEID SEQ ID NO: 26, IETD SEQ ID NO: 24 a granzym B zahrnující IEPD SEQ ID NO: 23 a VEPD SEQ ID NO: 27. Symbol x představuje peptid s chráněným N-koncem, který odpovídá karboxyterminálnímu nebo aminoterminálnímu fragmentu, který zahrnuje 1, 2, 3 nebo 4 aminokyseliny tetrapeptidového substrátu kaspázy zahrnující WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, SHVD SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO: 21, VEID SEQ ID NO: 26, IETD SEQ ID NO: 24 a granzym B zahrnující IEPD SEQ ID NO: 23 a VEPD SEQ ID NO: 27 plus 1 až 2 aminokyseliny odpovídající P_1'-P_2'části substrátu kaspázy zahrnující G, A, GA, GG a AG.

Nové fluorogenní nebo fluorescenční reportní látky podle vynálezu jsou látky obecného vzorce V:

$$R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp\text{-}y\text{-}R_6 \qquad (V)$$

12.06.00

nebo její biologicky přijatelné sole nebo pro-reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu, která je obsažena aminokyselinových zbytcích), kde:

R_1 představuje skupinu chránící N-konec, jako je t-butyloxykarbonyl, acetyl, oktanoyl a benzyloxykarbonyl,

každé AA nezávisle znázorňuje zbytek libovolné přirozené nebo nepřirozené α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny nebo derivát α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny,

každý symbol n má hodnotu 0 až 5,

symbol y je fluorogenní nebo fluorescenční část,

R_6 je chránící skupina, která není aminokyselinou nebo derivátem aminokyseliny.

Nové fluorogenní nebo fluorescenční reportní molekuly podle vynálezu obecného vzorce VII až IX jsou deriváty rodaminů zahrnující rodamin 110, rodamin 116 a rodamin 19. Tyto nové fluorgenní nebo fluorescenční reportní molekuly se připravují tak, že se nejdříve zavede chránící skupina R_6 na jednu ze dvou aminoskupin rodaminu za vzniku nového fluorescenčního barviva obecného vzorce VI. Zbývající skupina HNR_2 se používá při reakci s potenciálním enzymovým substrátem za vzniku fluorogenního substrátu obecného vzorce VII až IX. Chráněním jedné ze dvou aminoskupin v rodaminu se ve s rovnání s bis-substituovaným rodaminem zmenšuje velikost substrátu. Je důležité, aby se chránící skupina vybrala tak, že:

a) je stabilní a nebude hydrolyzovat za biologických podmínek. Tak jsou vyloučeny aminokyseliny, protože vytvořená peptidová vazba může být potencionálně štěpena peptidázami, které se nacházejí v buňkách,

b) upřednostňuje se, aby chránící skupina nebyla příliš velká (je například malá), aby se mohla zmenšit velikost molekuly peptid-reporter tak, že bude tvořit lepší enzymatický susbtrát,

12.06.00

c) upřednostňuje se, aby byla přirozeně hydrofóbní tak, aby se zvýšila buněčná permeabilita fluorogenní nebo fluorescenční molekuly.

Preferované chránící skupiny R_6 zahrnují, ale nejsou omezeny na C_{2-12} alkylkarbonylovou skupinu, jako je metoxykarbonyl, etoxykarbonyl, hexyloxykarbonyl, oktyloxykarbonyl, decyloxykarbonyl a dodecyloxykarbonyl, a C_{2-12} (alkylthio)karbonylovou skupinu, jako je (etylthio)karbonyl, (hexylthio)karbonyl, (oktylthio)karbonyl, a arylalkyloxykarbonylovou skupinu, jako je benzyloxykarbonyl, a C_{2-12} acylalkanoylovou skupinu, jako je acetyl a oktanoyl, karbamyl, jako je dimetylkarbamyl, N-metyl-N-hexylkarbamyl a alkylovou, haloalkylovou nebo aralkylsulfonylovou skupinu, jako je metansulfonyl.

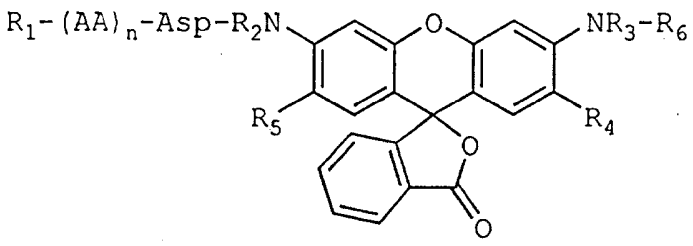
Zvláště preferované chránící skupiny R_6 zahrnují skupinu CH_3COOH-, $CH_3(CH_2)_pOCO$- (kde symbol p je 1 až 11), Cbz, Cl_3CCH_2OCO- (karbamátová série); $Me(OCH_2CH_2)_qOCO$- (kde symbol q je 1 až 4) a $CH_3(CH_2)_r(OCH_2CH_2)_sOCO$- (kde symbol r je 0 až 5, symbol s je 1 až 4), (alkyloxyalkylkarbamátová série); EtSCO-, $CH_3(CH_2)_7SCO$-, $CH_3(CH_2)_9SCO$- a $CH_3(CH_2)_tSCO$- (kde symbol t je 0 až 11) (thiokarbamátová série); Ts-, $PhSO_2$-, $CH_3(CH_2)_uSO_2$- (symbol u je 0 až 11), $PhCH_2SO_2$- a CF_3SO_2- (sulfonamidová série); Me_2NCO-, Et_2NCO-, a N-Me-N-$CH_3(CH_2)_vNCO$ (symbol v je 0 až 9) (série močoviny) a HCO-, CH_3CO-, $CH_3(CH_2)_wCO$ (symbol w je 0 až 9), $PhCH_2CO$- a PhCO- (amidová série).

Nové fluorogenní nebo fluorescenční reportní molekuly obecného vzorce VII až IX se připravily reakcí aminoskupiny NHR_2 nových fluorescenčních barviv obecného vzorce VI s potencionálním enzymovým substrátem, jako je karboxylová skupina peptidu s chráněným N-koncem za vzniku peptidové amidové vazby. Reakce přeměňuje fluorescenční molekulu obecného vzorce VI na nefluorescenční molekulu peptid-reporter obecného vzorce VII až IX, která je substrát pro proteázu nebo peptidázu. Je proto velmi důležité, že chránící skupina vazby

12.06.00

R_6-N obecného vzorce VII se nemůže štěpit a že amidová vazba molekuly peptid-reporter není štěpitelnou vazbou za biologických podmínek. Štěpení štěpitelné amidové vazby peptid-reporter obecného vzorce VII-IX proteázami nebo peptidázami produkuje látku obecného vzorce VI nebo VI, která je fluorescenční.

Speciálně preferovaná provedení látek obecného vzorce V jsou látky obecného vzorce VII:



VII

nebo její biologicky přijatelné sole nebo reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích),

R_2 a R_3 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

R_6 je chránící skupina, kterou není aminokyselina nebo derivát aminokyseliny,

R_4 a R_5 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík nebo alkyl.

R_1 je skupina chránící N-konec,

každé AA nezávisle znázorňuje zbytek libovolné přirozené nebo nepřirozené α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny nebo derivát α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny,

každý symbol n má hodnotu 0 až 5. Štěpitelná vazba je vazba Asp-N obecného vzorce VII.

Symbol R_2 a R_3 s výhodou představují vodík, metyl nebo etyl,

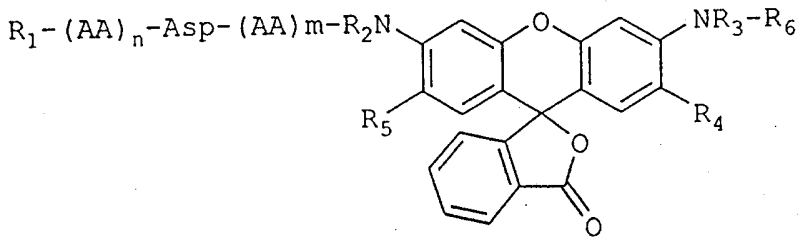
Symbol R_4 a R_5 s výhodou představují vodík nebo metyl.

12.06.00

Preferované aminokyseliny zahrnují přirozené aminokyseliny zahrnující tyrozin, glycin, fenylalanin, methionin, alanin, serin, izoleucin, leucin, threonin, valin, prolin, lyzin, histidin, glutamin, kyselina glutamová, tryptofan, arginin, kyselina aspartová, asparagin nebo cystein. Nepřirozené aminokyseliny zahrnují t-butylglycin a N,N-dimetylglutamin.

Příkladem pro-reportní molekuly jsou látky obecného vzorce VII zahrnující aminokyselinové zbytky obsahující metylesterovou formu karboxylu. Jiným příkladem pro-reportní molekuly jsou látky obecného vzorce VII zahrnující aminokyselinové zbytky obsahující acetoxymetyl(AM)esterovou formu karboxylu.

Jiná skupina preferovaných provedeních látek obecného vzorce I jsou látky obecného vzorce VIII:



VIII

nebo její biologicky přijatelné sole nebo reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená v aminokyselinových zbytcích),

kde R_1, R_6, AA a n jsou definovány shora v textu v obecném vzorci II a V,

m představuje celé číslo od 0 do 3,

R_2 a R_3 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

R_4 a R_5 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík nebo alkyl.

12.06.00

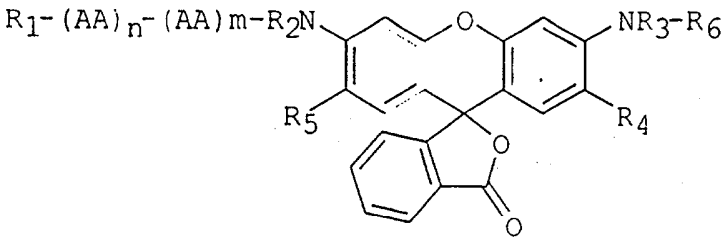
Látky obecného vzorce VIII jsou nové fluorogenní nebo fluorescenční substráty vhodné pro kaspázy nebo jiné enzymy spojené s apopatózou. V případě, že symbol m má hodnotu 0 štěpení amidové vazby mezi Asp a rodaminem přemění fluorogenní substrát na fluorescenční barvivo obecného vzorce VI. V případě, že symbol m má hodnotu 0 štěpení amidové vazby mezi Asp a $(AA)_m$ bude štěpit rodamin připojený k NH_2-$(AA)_m$. Zbývající aminokyseliny $(AA)_m$ se pak odstraní aminopeptidázou přítomnou v buňkách za vzniku fluorescenčního barviva obecného vzorce VI. $(AA)_m$ se může vytvořit tak, aby odpovídala sekvenci P´ štěpitelného místa substrátů kaspáz nebo enzymů spojených s apoptózou. Začleněním sekvence P´známých substrátů kaspáz nebo enzymů spojených s apoptózou se očekává zvýšení specifity a afinity fluorogenních substrátů. Protože aminopeptidázy jsou zastoupeny v buňkách, je možné začlenit sekvenci $(AA)_m$ v provedení substrátů obecného vzorce VIII vhodné pro testy s celými buňkami. Existuje další výhoda testů s celými buňkami ve srovnání bezbuněčnými enzymatickými testy. Například když $(AA)_m$ je Gly, substrát obecného vzorce VIII bude fungovat v testech s celými buňakmi, ale v jiném případě nebude fungovat v bezbuněčném kaspázovém testu, protože štěpení amidové vazby Asp-Gly nechá Gly připojené k rodaminu, který není fluorescenční.

Příkladem pro-reportní molekuly jsou látky obecného vzorce VIII zahrnující aminokyselinové zbytky obsahující metyl- nebo etylesterovou formu karboxylu. Jiným příkladem pro-reportní molekuly jsou látky obecného vzorce VIII zahrnující aminokyselinové zbytky obsahující acetoxymetyl(AM)- nebo pivaloyloxymetyl(PM)esterovou formu karboxylu. Je známo, že látky obsahující AM-estery karboxylu vstupují do buněk a mohou se hydrolyzovat esterázami uvnitř buněk. Po té, co se hydrolyzují, látky obsahující kraboxylovou skupinu se stávají neprůchodnými buněčnou membránou a jsou uzavřeny uvnitř buněk (popisuje se v publikaci Adams et al., J. Am. Chem. Soc. 111:

12.06.00

7957-7968 (1989)). AM-estery se mohou připravit reakcí odpovídajících látek obsahující karboxylovou skupinu a brommetylacetátem.

Jinou skupinou preferovaných provedení látek obecného vzorce I jsou látky obecného vzorce IX:



IX

nebo její biologicky přijatelné sole nebo pro-reportní molekuly (jako je metylesterová forma karboxylu obsažená aminokyselinových zbytcích),

kde R_1, R_6, AA a n jsou definovány shora v textu v obecném vzorci II a V,

m představuje celé číslo od 0 do 3,

R_2 a R_3 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

R_4 a R_5 jsou stejné nebo odlišné a představují nezávisle vodík nebo alkyl.

Symbol R_1 představuje s výhodou t-butyloxykarbonyl, acetyl, oktanoyl a benzyloxykarbonyl. Symbol n má s výhodou hodnotu 1 až 4. Preferované symboly R_2 a R_3 představují nezávisle vodík, metyl nebo etyl. Preferované symboly R_4 a R_5 představují nezávisle vodík nebo metyl. Preferované chránící skupiny R_6 zahrnují, ale nejsou omezeny na C_{2-12} alkylkarbonylovou skupinu, jako je metoxykarbonyl, etoxykarbonyl, hexyloxykarbonyl, oktyloxykarbonyl, decyloxykarbonyl a dodecyloxykarbonyl skupina, a C_{2-12} (alkylthio)karbonylovou skupinu, jako je (etylthio)karbonyl, (hexylthio)karbonyl, (oktylthio) karbonyl,

12.06.00

a arylalkyloxykarbonylovou skupinu, jako je benzyloxykarbonyl, a C_{2-12} acylalkanoylovou skupinu, jako je acetyl a oktanoyl, karbamylovou skupinu, jako je dimetylkarbamyl, N-metyl-N-hexylkarbamyl a alkylovou, haloalkylovou nebo aralkylsulfonylovou skupinu, jako je metansulfonyl.

V obecném vzorci IX je $(AA)_n$ tvořen aminokyselinou nebo peptidem, který je rozeznáván specifickou peptidázou nebo proteázou, jako sekvence na straně p a bude se štěpit cílovou peptidázou nebo proteázou. $(AA)_m$ tvoří aminokyselina nebo peptid, který rozeznává specifická peptidáza nebo proteáza, jako sekvenci na straně P´, která se může odstranit aminopeptidázami přítomnými v buňkách. V případě, že symbol R_1 představuje N-terminální chránící skupinu, jako je t-butyloxykarbonyl, acetyl nebo Cbz, látky obecného vzorce IX jsou substráty endopeptidáz, jako je katepsin D, nebo proteáz, jakoje HIV proteáza. V případě, že R_1 představuje H pak látky obecného vzorce IX jsou substráty exopeptidáz, jako je aminopeptidáza methioninu.

Zvláště látky obecného vzorce IX se navrhly tak, aby tvořily substráty pro aminopeptidázu methioninu typu 2 (MetAP-2). Dvě nezávislé výzkumné skupiny (popisuje se v publikaci Sin, N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 6099-6103 (1997), Griffith, E. C., et al., Chem. Biol. 4: 461-471 (1997))stanovily, že MetAP-2 je běžný cíl inhibitoru angiogeneze AGM-1470, což je lék proti zhoubnému bujení, jehož vývoj je v současné době ve fázi klinických testů. MetAP-2 je bifunkční enzym, který také reguluje syntézu proteinu a působí ve fázi fosforylace eIF-2. Popisuje se, že AGM-1470 pouze inhibuje aminopeptidázovou aktivitu MetAP-2 a nepůsobí na regulační aktivitu MetAP-2 (popisuje se v publikaci Griffith, E. C., et al., Chem. Biol. 4: 461-471 (1997)). Protože inhibitor angiogeneze, jako je AGM-1470, je znám, že je schopen selektivně usmrcovat buňky zhoubného bujení, očekává

12.06.00

se, že inhibitory MetAP-2 mají anti-angiogenní vlastnosti a jsou potencionálními novými léky proti zhoubnému bujení.

MetAP-2 je enzym závislý na kobaltu, který hydrolyzuje aminoterminální methionin u jistých proteinů. Jeho preferované substráty jsou Met-X-Y. Kde symbol X představuje aminokyselinu s malými a nenabitými vedlejšími skupinami, jako je Gly, Ala, Ser. Zatímco Leu, Met, Arg a Tyr vedou ke vzniku neaktivních susbtrátů. Symbol Y může představovat Ser, Met, Gly nebo jiné aminokyseliny (popisuje se v publikaci (Li, X. and Chang, Y.-H., Biochem. Biophy. Res. Com. 227: 152-159 (1996)). Protože rodamin je daleko větší než aminokyselina, pak látka, která obsahuje methionin přímo připojený na rodaminu nebude substrátem vhodným pro MetAP-2. V případě přítomnosti aminopeptidázy v celých buňkách začlenění sekvence $(AA)_m$ mezi methionin a rodamin bude tvořit substrát vhodný pro MetAP-2. Očekává se, že tento substrát bude fungovat v testu s celými buňkami, ale nebude fungovat v bezbuněčném testu enzymu MetAP-2.

V případě látek obecného vzorce IX, které tvoří substráty MetAP-2 preferovaný symbol R_1 představuje H, preferovaný $(AA)_n$ je Met a preferovaný $(AA)_m$ je Gly, Ala, Gly-Gly, Ala-Gly nebo Gly-Ala. Methionin se bude štěpit v endoteliálních buňkách aminopeptidázou methioninu typ 2 za vzniku rodaminu připojeného k $(AA)_m$. Aminopeptidázy přítomné uvnitř buněk pak odstraní $(AA)_m$ za vzniku fluorescenčního barviva obecného vzorce VI. Látky obecného vzorce IX se používají k testování inhibitorů MetAP-2 v endoteliálních buňkách, přičemž se očekává, že tyto testy povedou k identifikaci nových léků proti zhoubnému bujení.

Látky obecného vzorce IX se mohou navrhnout tak, aby tvořily substrát HIV proteázy. HIV proteáza je aspartová proteáza, která zpracovává polypeptidy přepisované z genů *gag* a *pol*, a je podstaná při dozrávání infekčních virů. Proto HIV proteáza je jedním z hlavních cílů chemoterapeutické

12.06.00

intervence HIV. Ukázalo se, že několik inhibitorů HIV proteáz vykazují silný potenciál při léčbě HIV a upravily se pro obchodování. Většina těchto inhibitorů HIV proteáz se připravila na základě struktury substrátů proteáz. Proto tyto látky jsou buď peptidy nebo napodobují peptidy. Očekávalo se, že hledání nových inhibitorů HIV proteáz poskytne více účinné léky vhodné pro boj se smrtelným onemocněním.

Preferované substráty HIV proteáz jsou peptidy se štěpitelnou hydrofóbní-hydrofóbní nebo aromatickou prolinovou vazbou mezi P_1-P_1´(popisuje se v publikaci West, M. L., and Fairlie, D. P., Trand. Pharm. Sci. 16: 67-74 (1995)). Ve virových proteinech gag a gag-pol se zjistilo devět rozdílných míst, které štěpí uvedená proteáza (popisuje se v publikaci Martin, J. A., et al., Prog. Med. Chem. 32: 239-287 (1995)). Sekvence P_4-P_3´těchto devíti míst jsou Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val SEQ ID NO: 28, Ala-Arg-Val-Leu-Ala-Glu-Ala SEQ ID NO: 29, Ala-Thr-Ile-Met-Met-Gln-Arg SEQ ID NO: 30, Arg-Gln-Ala-Asn-Phe-Leu-Gly SEQ ID NO: 31,Pro-Gly-Asn-Phe-Leu-Gln-Ser SEQ ID NO: 32, Ser-Phe-Ser-Phe-Pro-Gln-Ile SEQ ID NO: 33, Thr-Leu-Asn-Phe-Pro-Ile-SerSEQ ID NO: 34, Ala-Glu-Thr-Phe-Tyr-Val-Asp SEQ ID NO: 35 a Arg-Lys-Val-Leu-Phe-Leu-Asp SEQ ID NO: 36. Řada fluorogenních, radioaktivních nebo chromogenních substrátů HIV proteáz se připravila na základě těchto přirozených substrátů testů aktivity HIV proteázy. Fluorogenní substrát zhášený intramolekulárně, jako je 2-aminobenzoyl-Thr-Ile-Nle-(4-NO_2-Phe)-Gln-Arg-NH_2 SEQ ID NO: 141, kde štěpitelná vazba je Nle-(4-NO_2-Phe) se připravil na základě místa štěpení p24/p15 získaného z hexapeptidového susbtrátu (popisuje se v publikaci Toth, M. V. and Marshall, G. R., Int. J. Pept. Protein Res. 36: 544-550 (1990)). Fluorometrický test pro měření aktivity HIV proteázy za použití HPLC, kde se jako substrát použil N-Dns-Ser-Gln-Asn-Tyr-Por-Ile-Val SEQ ID NO: 28 se popisuje v publikaci Tamburini, P. P., et al., Anal. Biochem. 186: 363-368 (1990)), kde vazba Tyr-Pro je

12.06.00

štěpitelnou vazbou. Vyvinula se řada jiných substrátů HIV proteáz začleňující sekvence z obou konců P a P´míst štěpení substrátů HIV proteáz. Tyto substráty začleňují fluorogenní N-alfa-benzoyl-Arg-Gly-Phe-Pro-MeO-beta-naftylamid SEQ ID NO: 37, který obsahuje dipeptidovou vazbu Phe-Pro, kterou rozeznává HIV-1 proteáza (popisuje se v publikaci Tyagi, S. C., and Carter, C. A., Anal. Biochem. 200: 143-148 (1992)); radioaktivně značený heptapeptidový substrát [tyrosyl-3,5-^{3}H]Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH_2 SEQ ID NO: 38, který je založený na p17-p24 místě štěpení Tyr-Pro, které se nachází ve virovém polyproteinovém susbtrátu Pr55gag (popisuje se v publikaci Hyland, L. J., et al., Anal. Biochem. 188: 408-415 (1990)); peptid založený na angiotensinu I Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-pro-Phe-His-Leu-Leu-Glu-Glu-Ser SEQ ID NO: 39, který dává vzniku angiotensinu I (Ang I) a Leu-Glu-Glu-Ser SEQ ID NO: 40 (popisuje se v publikaci Evans, D. B., et al., Anal. Biochem. 206, 288-292 (1992)); substrát pro transfer intramolekulární fluorescenční rezonanční energie (FRET) 4-(4-dimetylaminofenylazo)benzoová kyselina (DABCYL)-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-5-[(2-aminoetyl)amino]naftalen-1 SEQ ID NO: 41 sulfonová kyselina (EDANS), kde Tyr-Pro je místo štěpení (popisuje se v publikaci Matayoshi, E.D. et al., Science 247: 954-958 (1990)); a chromoforní peptidové substráty H-Ser-Gln-Asn-Leu-Phe(NO_2)-Leu-Asp-Gly-NH_2 SEQ ID NO: 42 a acetyl-Arg-Lys-Ile-Leu-Phe(NO_2)-Leu-Asp-Gly-NH_2 SEQ ID NO: 43, kde amidová vazba mezi p-nitrofenylalanylovými a leucylovými zbytky je štěpitelná vazba. Navíc v publikaci Richards te al., J. Biol. Chem. 265: 7733-7736 se popisuje chromogenní substrát Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Phe(NO_2)-Glu-Ala-Met SEQ ID NO: 44, kde Leu-Phe(NO_2) je místo štěpení. Studie SAR zjistily, že substituce zbytku Leu v P_1 s norleucinem, Met, Phe nebo Tyr má minimální účinek na kinetické parametry (K_{cat} a K_{cat}/K_m), jak se stanovilo při různých hodnotách pH, zatímco peptidy obsahující Ile nebo Val v P_1 se hydrolyzují extrémně pomalu. V případě, že v celých

12.06.00

buňkách jsou přítomny nespecifické aminopeptidázy, fluorogenní nebo fluorescenční substráty HIV proteázy obecného vzorce IX se mohou navrhnout tak, aby začleňovaly aminokyseliny z obou stran P a P´ HIV substrátu vhodného pro aplikaci v testech s celými buňkami. Očekává se, že substrát se štěpí HIV proteázou po peptidové sekvenci na konci P a peptidová sekvence P´se odstraní aminopeptidázou přítomnou v buňkách.

V případě látek obecného vzorce IX, které se vytvořily jako substrát vhodný pro HIV proteázu, preferovaný symbol R_1 je acetylová skupina nebo Cbz, preferovaným $(AA)_n$ je Ser-Leu-Asn-Phe SEQ ID NO: 54 nebo Leu-Asn-Phe a preferovaným $(AA)_m$ je Pro-Ile-Val, Pro-Ile nebo Pro, nebo Ser-Gln-Asn-Tyr SEQ ID NO: 45 nebo Gln-Asn-Gly a preferovaným $(AA)_m$ je Pro-Ile-Val-Gln SEQ ID NO: 46, Por-Ile-Val, Pro-Ile-Val, Pro-Val-Val-NH_2, Pro-Val-NH_2, Pro-Ile nebo Pro nebo preferovaným $(AA)_n$ je Arg-Gly-Phe a preferovaným $(AA)_m$ je Pro nebo preferovaným $(AA)_n$ je Lys-Ala-Arg-Val-Leu SEQ ID NO: 47, Ala-Arg-Val-Leu SEQ ID NO: 48 nebo Arg-Val-Leu a preferovaným $(AA)_m$ je Phe-Glu-Ala-Met SEQ ID NO: 49, Phe-Glu-Ala, Phe-Glu nbeo Phe nebo preferovaným $(AA)_n$ je Pro-Phe-His-Leu SEQ ID NO: 50 nebo Phe-His-Leu a preferovaným $(AA)_m$ je Leu-Glu-Glu-Ser SEQ ID NO: 40, Leu-Glu-Glu, Leu-Glu nebo Leu nebo preferovaným $(AA)_n$ je Ser-Gln-Asn-Leu-Phe SEQ ID NO: 140, Gln-Asn-Leu-Phe SEQ ID NO: 51, Asn-Leu-Phe, Arg-Lys-Ile-Leu-Phe SEQ ID NO: 52, Lys-Ile-Leu-Phe SEQ ID NO: 53 nebo Ile-Leu-Phe a preferovaným $(AA)_m$ je Leu-Asp-Gly-NH_2, Leu-Asp-NH_2, nebo Leu-NH_2. Více se preferuje, jestliže $(AA)_n$ je Pro-Ile-Val, Pro-Ile nebo Pro. Více se preferuje, když $(AA)_n$ je Arg-Gly-Phe a více se preferuje, když $(AA)_m$ je Pro.

Očekává se, že substráty HIV proteáz obecného vzorce IX fungují v testech, kde se používají celé buňky, ale nefungují v bezbuněčných enzymatických testech. Štěpení amidové vazby $(AA)_n$-$(AA)_m$ HIV proteázou v buňkách infikovaných HIV za vzniku rodaminu připojeného k $(AA)_m$. Aminopeptidáza přítomna uvnitř buněk pak odstraní $(AA)_m$ za vzniku fluorescenčního barviva

12.06.00

obecného vzorce VI. Látky obecného vzorce IX se použijí pro testování inhibitorů proteázy HIV v buňkách infikovaných HIV. To by mělo urychlit proces vývoje nových inhibitorů proteáz HIV, zvláště pak inhibitorů proteáz HIV, které nejdou peptidové nebo nenapodobují peptidy, což vede k objevení lepších činidel působícím proti HIV ve srovnání se současně dostupnými léky. Protože proteáza HIV zpracovává virové prekurzorové proteiny v pozdní fázi virové replikace může se fluorogenní nebo fluorescenční substrát vhodný pro proteázu HIV také použít k testování látek, které inhibují transkripci nebo translaci genů, vstup viru nebo jiné klíčové proteiny v časné fázi infekce HIV. Proto tato metoda může vést k identifikaci inhibitorů infekcí HIV s novým mechanizmem, které nelze identifikovat v bezbuněčném enzymatickém testu. Navíc HIV proteáza v buňkách infikovaných HIV bude štěpit substrát obecného vzorce IX, který vstupuje do buněk, za vzniku fluorescenčního barviva obecného vzorce VI uvnitř buněk. Substráty obecného vzorce V je možné také použít při diagnostice infekce HIV.

Látky obecného vzorce IX se navrhly tak, aby mohly tvořit substráty adenovirových proteáz. Adenovirus způsobuje několik onemocnění, které zahrnují řídké respirační onemocnění a nakažlivé akutní respirační onemocnění, které může vést k zánětu plic. Adenovirová proteináza je cysteinová proteáza, která štěpí několik virových proteinů je nutná při dozrávání virů a infekci viry (popisuje se v publikaci Weber, J. M. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199/I:227-235 (1995)). Preferované substráty adenovirové proteázy zahrnují (M,L,I)XGX-G a (M,L,I)XGG-X. Specifita subtrátů je hlavně určena aminokyselinami P_2 a P_4 (Diouri, M. et al., J. Biol. Chem. 271: 32511-32514 (1996)). V poloze P_4 se preferují hydrofóbní aminokyseliny, jako jsou Met, Ile a Leu. Malá aminokyselina, jako je Gly, se preferuje v poloze P_2. V poloze P_1 a P_1' se také preferuje malá a hydrofóbní aminokyselina,

12.06.00

jako je Ala a Gly, zatímco v poloze P_3 se může nacházet skoro jakákoliv aminokyselina. Tato pozorování se podpořila stanovením krystalické struktury lidské adenovirové proteázy s jejím ko-faktorem tvořeným 11 aminokyselinami a úpravou substrátu založenou na krystalické struktuře (Ding, J., et al., EMBO J. 15: 1778-1783 (1996)). Když se využívá výhody přítomnosti aminopeptidázy v celých buňkách, mohou se vytvořit fluorogenní nebo fluorescenční substráty adenovirové proteázy, které nesou aminokyseliny pouze na konci P nebo na obou koncích P a P´substrátu adenovirové proteázy při aplikaci testů s celými buňkami.

Látky obecného vzorce IX se mohou vytvořit tak, aby sloužily jako substráty adenovirových proteáz. Preferuje se, aby symbol R_1 byl acetyl nebo Cbz. Preferovaným $(AA)_n$ je Leu-Arg-Gly-Gly-SEQ ID NO: 55, Met-Arg-Gly-Gly SEQ ID NO: 56, Ile-Arg-Gly-Gly SEQ ID NO: 57, Leu-Val-Gly-Gly SEQ ID NO: 58, Met-Val-Gly-Gly SEQ ID NO: 59 nebo Ile-Val-Gly-Gly SEQ ID NO: 60 a preferovaným $(AA)_m$ je Gly, Ala nebo m=0. V případě, že m=0, štěpením amidové vazby $(AA)_n$-rodamin adenovirovou proteázou vzniká fluorescenční barvivo obecného vzorce VI. Když m není rovno 0, štěpením amidové vazby $(AA)_n$-$(AA)_m$ adenovirovou proteázou v buňkách vzniká rodamin připojený na $(AA)_m$. Aminopeptidázy přítomné uvnitř buněk pak odstraní $(AA)_m$ za vzniku fluorescenčního barviva obecného vzorce VI. Látky obecného vzorce IX se používají protestování inhibitorů adenovirových proteáz v buňkách infikovaných adenovirem.

Látky obecného vzorce IX se mohou také navrhnout, aby sloužily jako substráty pro proteázy viru herpes simplex typ 1 (HSV-1). Lidský virus herpes simplex typ 1 odpovídá za herpes labialis (opar na rtech). Proteáza HSV-1 je proteáza serinu a zodpovídá za zpracování sebe sama a ICP35 při tvoření virového obalu (popisuje se v publikaci Gao, M., et al., J. Virol. 68: 3702-3712 (1994)). V proteáze se identifikovaly dvě proteolytická místa. Jsou to Ala247 a Ser248 a Ala610 a Ser611

12.06.00

(popisuje se v publikaci Dilanni, C. L., et al., J. Biol. Chem. 268: 25449-25454 (1993)). Našel se peptid obsahující 8 aminokyselin se sekvencí LVLASSSF SEQ ID NO: 61, který se štěpí se stejnou účinností jako 20-mérový peptid místa maturace. Sekvence P_4 až P_1 se definovala jako minimální oblast substrátu rozeznávaná proteázou HSV-1 (popisuje se v publikaci O´Boyle, D. R., et al., Virology 236: 338-347 (1997)). Také se uvádí, že specifita zbytků proteázy HSV-1 v oblasti P_4 až P_1 štěpících míst (McCann, P.J., et al., J. Virol. 68: 526-529 (1994)). Využívaje výhody přítomnosti aminopeptidázy v celých buňkách, fluorogenních nebo fluorescenčních substrátů proteázy HSV-1 jsou připraveny tak, že začleňují aminokyseliny buď pouze z polohy P_4 až P_1 nebo z obou konců P_4 až P_1 a P´substrátu proteázy HSV-1 při aplikacích testů s celými buňkami.

U látek obecného vzorce IX vytvořených tak, aby se staly substráty pro proteázu HSV-1 se preferuje, aby symbol R_1 byl acetyl nebo Cbz. Preferovaným $(AA)_n$ je Leu-Val-Leu-Ala SEQ ID NO: 62 a preferovaným $(AA)_m$ je Ser, Ser-Ser nebo m je rovno 0. Když m je rovno 0, pak štěpením amidové vazby $(AA)_n$-rodamin proteázou HSV-1 vzniká fluorescenční barvivo obecného vzorce VI. V případě, že m je rovno 0, štěpením amidové vazby $(AA)_m$-$(AA)_n$ HSV-1 v buňkách vzniká rodamin připojený k $(AA)_m$. Aminopeptidázy přítomné uvnitř buněk pak odstraní $(AA)_m$ za vzniku fluorescenčního barviva obecného vzorce VI. Látky obecného vzorce IX se mohou použít při testování inhibitorů proteázy HSV-1 v buňkách infikovaných HSV-1.

Látky obecného vzorce IX se mohou připravit tak, aby tvořily substráty vhodné pro proteázu lidského cytomegaloviru (HCMV). HCMV může způsobovat infekci ohrožující lidský život u kojenců s kogenitální infekcí, imunokompromitovaných jedinců a imunosupresívních pacientů se zhoubným bujení a po transplantaci. Lidské cytomegaloviry (HCMV) kódují proteázu, která se sama štěpí, a dále štěpí protein (HCMV) a je nutná pro replikaci viru, proto je potenciální cíl terapeutické

12.06.00

intervence. Proteáza HCMV je proteáza serinu. V proteáze se objevily dvě místa proteolytického zpracování v poloze Ala256-Ser257 (místo uvolnění) a Ala643-Ser644 (místo zrání) (popisuje se v publikaci Sztevens, J. T., et al., Eur. J. Biochem. 226: 361-367 (1994)). Syntetizoval se fluorogenní substrát se sekvencí DABCYL-Arg-Gly-Val-Val-Asn-Ala-Ser-Ser-Arg-Leu-Ala-EDANS SEQ ID NO: 63. Zjistilo se, že ho účinně štěpí CMV proteáza v peptidové vazbě Ala-Ser (popisuje se v publikaci Holskin, B. P. et al., Anal. Biochem. 227: 148-155 (1995)). Uvádí se, že nahrazení sekvence Val-Val-Asn odpovídající zbytkům P_4 až P_2 místa maturace enzymu optimalizovanou sekvencí Tbg-Tbg-Asn(NMe_2) (Tbg, t-butylglycin) zvyšuje podstatnou afinitu substrátu k proteáze. Fluorogenní substrát AMC se připravil s peptidové sekvence P konce zahrnující tyto zdokonalené aminokyseliny (Bonneau, P. R. et al., Anal. Biochem. 255: 59-65 (1998)).

Využívaje výhody přítomnosti aminopeptidázy v celých buňkách, fluorogenní nebo fluorescenční substráty proteázy HCMV jsou připraveny tak, že začleňují aminokyseliny buď pouze z polohy P nebo z obou konců P a P´substrátu proteázy HCMV při aplikacích testů s celými buňkami.

U látek obecného vzorce IX vytvořených tak, aby se staly substráty pro proteázu HCMV se preferuje, aby symbol R_1 byl acetyl nebo Cbz. Preferovaným $(AA)_n$ je Val-Val-Asn-Ala SEQ ID NO: 64, Tbg-Tbg-Asn-Ala SEQ ID NO: 65 a preferovaným $(AA)_m$ je Ser, Ser-Ser nebo m je rovno 0. Když m je rovno 0, pak štěpením amidové vazby $(AA)_n$-rodamin proteázou HCMV vzniká fluorescenční barvivo obecného vzorce VI. V případě, že m je rovno 0, štěpením amidové vazby $(AA)_m$-$(AA)_n$ HCMV v buňkách vzniká rodamin připojený k $(AA)_m$. Aminopeptidázy přítomné uvnitř buněk pak odstraní $(AA)_m$ za vzniku fluorescenčního barviva obecného vzorce VI. Látky obecného vzorce IX se mohou použít při testování inhibitorů proteázy HCMV v buňkách infikovaných HCMV.

12.06.00

Látky obecného vzorce IX se mohou připravit tak, aby tvořily substrát vhodný pro proteázu viru hepatitidy C (HCV). HCV je hlavní kauzativní činidlo parenterálně přenosné a sporadické hepatitidy, která není hepatitida typu A ani B. Tímto virem je odhadem infováno přibližně 50 miliónů lidí po celém světě. Proteáza NS53 HCV a její proteinový aktivátor NS4A se podílí na zpracování virového polyproteinu tak, že proteázový komplex NS3/4A je atraktivní cíl pro antivirovou terapii proti HCV. HCV proteáza je serinová proteáza a Cys-Ser se identifikoval jako místo štěpení. Zjistilo se, že jedna ze substrátových sekvencí se sekvencí SEQ ID NO: 66 Asp-Asp-Ile-Val-Pro-Cys-Ser-Met-Ser-Tyr a P_1 Cys a P_3 je kritická (popisuje se v publikaci Zhang, R., et al., J. virol. 71:6208-6213 (1997)). Jestliže se využívá přítomnosti aminopeptidázy v celých buňkách, fluorogenní nebo fluorescenční susbtráty proteázy HCV jsou navrženy tak, že nesou aminokyseliny z konce P a P´substrátu proteázy HCV, který je vhodný pro aplikaci v testech s celými buňkami.

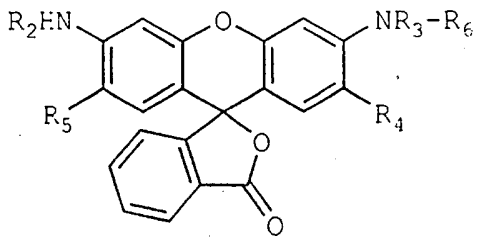
U látek obecného vzorce IX vytvořených tak, aby se staly substráty pro proteázu HCV se preferuje, aby symbol R_1 byl acetyl nebo Cbz. Preferovaným $(AA)_n$ je Asp-Asp-Ile-Val-Pro-Cys SEQ ID NO: 67, Asp-Ile-Val-Pro-Cys SEQ ID NO: 68 nebo Ile-Val-Pro-Cys SEQ ID NO: 69 a preferovaným $(AA)_m$ je Ser-Met-Ser-Tyr SEQ ID NO: 70, Ser-Met-Ser, Ser-Met, Ser nebo m je rovno 0. Když m je rovno 0, pak štěpením amidové vazby $(AA)_n$-rodamin proteázou HCV vzniká fluorescenční barvivo obecného vzorce VI. V případě, že m je rovno 0, štěpením amidové vazby $(AA)_m$-$(AA)_n$ HCV v buňkách vzniká rodamin připojený k $(AA)_m$. Aminopeptidázy přítomné uvnitř buněk pak odstraní $(AA)_m$ za vzniku fluorescenčního barviva obecného vzorce VI. Látky obecného vzorce IX se mohou použít při testování inhibitorů proteázy HCV v buňkách infikovaných HCV.

Vynález dále popisuje nové látky obecného vzorce VI, které jsou deriváty rodaminu a je možné je získat zavedením chránící

12.06.00

skupiny R_6 na jednu ze dvou aminoskupin na rodaminu. Skupina R_2NH v obecném vzorci VI poskytuje bod zachycení pro reakci s potencionálním enzymatickým susbtrátem, jako je karboxylová skupina peptidu s chráněným N-koncem, za vzniku amidové vazby. Reakce převádí fluorescenční molekulu obecného vzorce VI na molekulu obecného vzorce VII až IX, která není fluorescenční a produkuje molekulu peptid-reporter, která funguje jako substrát pro proteázu nebo peptidázu. Amidová vazba v molekule peptid-reporter obecného vzorce VII až IX je vazbou štěpitelnou za biologických podmínek. Štěpení štěpitelné vazby peptid-reporter v molekule peptid-reporter proteázou nebo peptidázou produkuje látku obecného vzorce VI nebo VI´, která je fluorescenční. Chránící skupina může začlenit hydrofóbní skupinu. Hydrofóbní skupina se připravila tak, aby se zvýšila membránová permeabilita substrátů a výsledek v akumulaci substrátu uvnitř buněk stejně jako zvýšená retence fluorescenční části uvnitř buněk po jeho štěpení proteázou nebo peptidázou.

Nová fluorescenční barviva podle vynálezu jsou barviva obecného vzorce VI:



VI

nebo biologicky přijatelné sole, kde

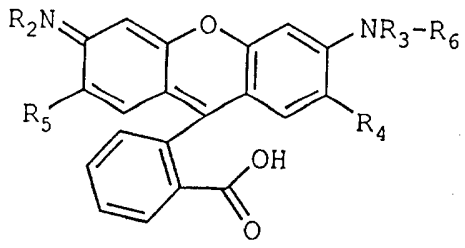
R_2-R_6 jsou definovány shora v textu s ohledem na obecný vzorec VII.

R_2 a R_3 s výhodou představují vodík, metyl nebo etyl.

R_4 a R_5 s výhodou představují vodík nebo metyl.

12.06.00

Látky obecného vzorce VI podle vynálezu mohou existovat v tautomerních formách, zvláště ve formě otevřeného kruhu obecného vzorce VI´. Vynález zahrnuje všechny tautomerní formy zahrnující VI a VI´.



VI

Preferované fluorogenní nebo fluorescenční substráty podle vynálezu jsou látky obecného vzorce II a zahrnují, ale nejsou omezeny na:

(Z-WEHD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

(Z-YVAD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

(Z-DETD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

(Z-DEVD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

(Z-DEHD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

(Z-VEHD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

(Z-LETD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

(Z-LEHD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

(Z-LEVD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

(Z-IEPD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

(Z-VEPD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 27

(Z-SHVD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 10

(Z-DELD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 11

(Z-DGPD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 12

(Z-DEPD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 13

(Z-DGTD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 14

(Z-DLND)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 15

(Z-DEED)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 16

12.06.00

(Z-DSLD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 17

(Z-DVPD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 18

(Z-DEAD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 19

(Z-DSYD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 20

(Z-ELPD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 21

(Z-VEID)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 26

(Z-IETD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 24

(Z-VD)$_2$-rodamin 110,

(Z-TD)$_2$-rodamin 110,

(Z-AD)$_2$-rodamin 110,

(Z-VAD)$_2$-rodamin 110,

(Boc-WEHD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

(Boc-YVAD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

(Boc-DETD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

(Boc-DEVD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

(Boc-DEHD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

(Boc-VEHD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

(Ac-YVAD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

(Ac-LETD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

(Ac-LEHD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

(Ac-DEVD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

(Ac-LEVD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

(Ac-IEPD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

(Ac-VEPD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 27

(Ac-VD)$_2$-rodamin 110,

(Ac-TD)$_2$-rodamin 110,

(Ac-AD)$_2$-rodamin 110,

(Ac-VAD)$_2$-rodamin 110,

(Z-YVAD)$_2$-rodamin 116, SEQ ID NO: 2

(Z-LEHD)$_2$-rodamin 116, SEQ ID NO: 3

(Z-DETD)$_2$-rodamin 116, SEQ ID NO: 4

(Z-DEVD)$_2$-rodamin 116, SEQ ID NO: 5

(Z-YVAD)$_2$-rodamin 19, SEQ ID NO: 2

(Z-LEHD)$_2$-rodamin 19, SEQ ID NO: 3

12.06.00

$(Z\text{-}DETD)_2$-rodamin 19, SEQ ID NO: 4

$(Z\text{-}DEVD)_2$-rodamin 19, SEQ ID NO: 5

$(Z\text{-}YVAD(OAM))_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

$(Z\text{-}LE(OAM)HD(OAM))_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

$(Z\text{-}D(OAM)E(OAM)TD(OAM))_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

$(Z\text{-}D(OAM)E(OAM)VD(OAM))_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

$(Z\text{-}D(OMe)E(OMe)VD(OAM))_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

$(Z\text{-}D(OMe)E(OMe)VD)_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

Preferované fluorogenní a fluorescenční substráty podle vynálezu jsou látky obecného vzorce VII a zahrnují, ale nejsou omezeny na:

N-(Z-WEHD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-LEHD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Z-LEVD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Z-DETD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Z-DEVD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-DEHD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Z-VEHD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Z-LETD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Z-IEPD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-VEPD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 27

N-(Z-SHVD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 10

N-(Z-DELD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 11

N-(Z-DGPD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 12

N-(Z-DEPD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 13

N-(Z-DGTD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 14

N-(Z-DLND)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 15

N-(Z-DEED)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 16

N-(Z-DSLD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 17

N-(Z-DVPD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 18

N-(Z-DEAD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 19

N-(Z-DSYD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 20

N-(Z-ELPD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 21

12.06.00

N-(Z-VEID)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 26

N-(Z-IETD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 24

N-(Z-VD)-N´-acetyl-rodamin 110,

N-(Z-TD)-N´-acetyl-rodamin 110,

N-(Z-AD)-N´-acetyl-rodamin 110,

N-(Z-VAD)-N´-acetyl-rodamin 110,

N-(Boc-WEHD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Boc-YVAD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-LETD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-LEHD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Z-DEVD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-YVAD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-LEVD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Z-LEHD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-WEHD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

12.06.00

N-(Ac-LEHD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3
N-(Ac-LETD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8
N-(Ac-VEHD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7
N-(Ac-IEPD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23
N-(Z-WEHD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1
N-(Z-YVAD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2
N-(Z-DEVD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5
N-(Z-LEVD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9
N-(Ac-WEHD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1
N-(Ac-YVAD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2
N-(Ac-DEVD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5
N-(Ac-DEHD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6
N-(Ac-DETD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4
N-(Ac-LEVD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9
N-(Ac-LEHD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3
N-(Ac-LETD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8
N-(Ac-VEHD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7
N-(Ac-IEPD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23
N-(Z-WEHD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1
N-(Z-YVAD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2
N-(Z-DEVD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5
N-(Z-LEVD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9
N-(Ac-WEHD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1
N-(Ac-YVAD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2
N-(Ac-DEVD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5
N-(Ac-DEHD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6
N-(Ac-DETD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4
N-(Ac-LEVD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9
N-(Ac-LEHD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3
N-(Ac-LETD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8
N-(Ac-VEHD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7
N-(Ac-IEPD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23
N-(Z-WEHD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1
N-(Z-YVAD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

12.06.00

N-(Z-DEVD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVAD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-DEVD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-YVAD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-LEVD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Z-LEHD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-WEHD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-DEVD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

12.06.00

N-(Ac-LEVD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-(metylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-DEVD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-YVAD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEHD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

12.06.00

N-(Z-YVAD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-LEVD)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-WEHD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

12.06.00

N-(Ac-DEHD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-LEVD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Ac-DEVD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-LETD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-WEHD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Z-YVAD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-lEVD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-WEHD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 1

N-(Ac-YVAD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

12.06.00

N-(Ac-DVED)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Ac-DEHD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 6

N-(Ac-DETD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Ac-LEVD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 9

N-(Ac-LEHD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Ac-LETD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 8

N-(Ac-VEHD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 7

N-(Ac-IEPD)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 23

N-(Z-DVED)-N´-metansulfonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-YVAD)-N´-metansulfonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DVED)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-YVAD)-N´-metansulfonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DVED)-N´-acetyl-rodamin 19, SEQ ID NO: 5

N-(Z-YVAD)-N´-metansulfonyl-rodamin 19, SEQ ID NO: 2

N-(Z-YVAD(OAM))-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-LE(OAM)HD(OAM))-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

N-(Z-D(OAM)E(OAM)TD(OAM))-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

N-(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-D(OMe)E(OMe)VD(OAM))-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-D(OMe)E(OMe)VD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-VD(OAM))-N´-acetyl-rodamin 110, a

N-(Z-E(OAM)VD(OAM))-N´-acetyl-rodamin 110.

Jiné preferované fluorogenní nebo fluorescenční susbtráty podle vynálezu jsou látky obecného vzorce VII a zahrnují, ale nejsou omezeny na:

N-(Z-WEHDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

12.06.00

N-(Z-YVADG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Z-LEHDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 73

N-(Z-LEVDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 74

N-(Z-DETDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 75

N-(Z-DEVDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-LETDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 77

N-(Ac-LEHDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 73

N-(Ac-WEHDG)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-metoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Z-WEHDGG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 79

N-(Z-YVADG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Z-DEVDG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Z-LEVDG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 74

N-(Z-WEHDG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

12.05.00

N-(Ac-DEHDG)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADGG)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 142

N-(Ac-DEVDG)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-(decylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Ac-DEVDG)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-(dimetylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Ac-WEHDG)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 71

N-(Ac-YVADG)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

12.06.00

N-(Ac-DEVDG)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Ac-DEHDG)-N´-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110, SEQ ID NO: 78

N-(Z-DEVDG)-N´-metansulfonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Z-YVADG)-N´-metansulfonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Z-DEVDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Z-YVADG)-N´-metansulfonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72

N-(Z-DEVDG)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 76

N-(Z-YVADG)-N´-metansulfonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 72.

Jiné preferované fluorogenní nebo fluorescenční substráty podle vynálezu jsou látky obecného vzorce IX a zahrnují, ale nejsou omezeny na:

N-(GP)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(GPG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(GP)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110,

N-(GP)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110,

N-(GPA)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110,

N-(GP)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(GP)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(GP)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110,

N-(GPG)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110,

N-(MG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(MA)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(MGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(MGA)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(MAG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-G-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(MG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110,

N-(MA)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110,

N-G-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110,

N-(MG)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(MA)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-G-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110,

12.06.00

N-(MG)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110,

N-G-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110,

N-(Boc-LM)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(Ac-LM)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(Boc-LM)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110,

N-(Ac-LM)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110,

N-(Boc-LM)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(Ac-LM)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110,

N-(Boc-LM)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110,

N-(Ac-LM)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110,

N-(Ac-SLNFPIV)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 80

N-(Ac-SLNFPI)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 81

N-(Ac-SLNFP)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 82

N-(Ac-SLNFPV)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 83

N-(Ac-LNFPI)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 84

N-(Ac-LNFP)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 85

N-(Ac-RGFP)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 37

N-(Z-LNFPIV)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 83

N-(Z-LNFPI)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 84

N-(Z-LNFP)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 85

N-(Z-RGFP)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 37

N-(Z-RQANFLG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 31

N-(Z-RQANFL)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 86

N-(Z-RQANF)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 87

N-(Z-RKVLFLD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 36

N-(Z-RKVLFL)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 88

N-(Z-RKVLF)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 89

N-(Z-ARVLFLG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 90

N-(Z-ARVLFL)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 91

N-(Z-ARVLF)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 92

N-(Z-SQNYFLG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 93

N-(Z-SQNYFL)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 94

N-(Z-SQNYF)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 95

N-(Ac-SLNFPIV)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 80

12.06.00

N-(Ac-SLNFPI)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 81

N-(Ac-SLNFP)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 82

N-(Ac-RGFP)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 37

N-(Ac-SLNFPIV)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 80

N-(Ac-SLNFPI)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 81

N-(Ac-SLNFP)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 82

N-(Ac-RGFP)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 37

N-(Ac-MRGGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 96

N-(Ac-IRGGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 97

N-(Ac-LVGGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 98

N-(Ac-MVGGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 99

N-(Ac-IVGGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 100

N-(Ac-LRGGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 101

N-(Ac-LRGGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 102

N-(Ac-LRGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 55

N-(Z-LRGGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 101

N-(Z-LRGGA)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 102

N-(Z-LRGG)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 55

N-(Ac-LRGGG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 101

N-(Ac-LRGGA)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 102

N-(Ac-LRGG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 55

N-(Ac-LRGGG)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 101

N-(Ac-LRGGA)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 102

N-(Ac-LRGG)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 55

N-(Ac-LVLASSS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 103

N-(Ac-LVLASS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 104

N-(Ac-LVLAS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 105

N-(Ac-LVLA)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 62

N-(Z-LVLASSS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 103

N-(Z-LVLASS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 104

N-(Z-LVLAS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 105

N-(Z-LVLA)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 62

N-(Ac-LVLASSS)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 104

12.06.00

N-(Ac-LVLAS)-N´-etoxkarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 105

N-(Ac-LVLA)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 62

N-(Ac-LVLASSS)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 104

N-(Ac-LVLAS)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 105

N-(Ac-LVLA)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 62

N-(Ac-VVNASSS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 106

N-(Ac-VVNAS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 107

N-(Ac-VVNA)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 64

N-(Ac-Tbg-Tbg-NASSS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 108

N-(Ac-Tbg-Tbg-NAS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 109

N-(Ac-Tbg-Tbg-NA)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 110

N-(Z-Tbg-Tbg-NASS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 108

N-(Z-Tbg-Tbg-NAS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 109

N-(Z-Tbg-Tbg-NA)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 110

N-(Ac-Tbg-Tbg-NASS)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 108

N-(Ac-Tbg-Tbg-NAS)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 109

N-(Ac-Tbg-Tbg-NA)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 110

N-(Ac-Tbg-Tbg-NASS)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 108

N-(Ac-Tbg-Tbg-NAS)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 109

N-(Ac-Tbg-Tbg-NA)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 110

N-(Ac-DDIVPCSMST)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 111

12.06.00

N-(Ac-DDIVPCSMST)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 111

N-(Ac-DIVPCSMST)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 112

N-(Ac-IVPCSMST)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 113

N-(Ac-IVPCSMS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 114

N-(Ac-IVPCSM)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 115

N-(Ac-IVPCS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 116

N-(Ac-IVPC)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 69

N-(Z-IVPCSMST)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 113

N-(Z-IVPCSMS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 1124

N-(Z-IVPCSM)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 115

N-(Z-IVPCS)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 116

N-(Ac-IVPCSMS)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 114

N-(Ac-IVPCSM)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 115

N-(Ac-IVPCS)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 116

N-(Ac-IVPCSMS)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 114

N-(Ac-IVPCSM)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 115

N-(Ac-IVPCS)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 116

kde symbol Z představuje benzyloxykarbonyl, BOC je terciální butoxykarbonyl, Ac je acetyl, Tbg je t-butylglycin a AM je acetoxymetyl.

Preferovaná nová fluorescenční barviva podle vynálezu jsou látky obecného vzorce VI a zahrnují a nejsou omezeny na:

N-formyl-rodamin 110

N-acetyl-rodamin 110

N-hexanoyl-rodamin 110

N-oktanoyl-rodamin 110

N-dekanoyl-rodamin 110

N-dodekanoyl-rodamin 110

N-metoxykarbonyl-rodamin 110

12.06.00

N-etoxykarbonyl-rodamin 110

N-butoxykarbonyl-rodamin 110

N-hexyloxykarbonyl-rodamin 110

N-oktyloxykarbonyl-rodamin 110

N-decyloxykarbonyl-rodamin 110

N-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110

N-benzyloxykarbonyl-rodamin 110

N-(2-butoxyetoxykarbonyl)-rodamin 110

N-(2,5,8-trioxadecyloxykarbonyl)-rodamin 110

N-(metylthio)karbonyl-rodamin 110

N-(etylthio)karbonyl-rodamin 110

N-(butylthio)karbonyl-rodamin 110

N-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110

N-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110

N-(decylthio)karbonyl-rodamin 110

N-(dodecylthio)karbonyl-rodamin 110

N-metansulfonyl-rodamin 110

N-etansulfonyl-rodamin 110

N-metansulfonyl-rodamin 110

N-hexansulfonyl-rodamin 110

N-oktansulfonyl-rodamin 110

N-dekansulfonyl-rodamin 110

N-dodecansulfonyl-rodamin 110

N-trifluormetansulfonyl-rodamin 110

N-dimetylkarbamyl-rodamin 110

N-dietylkarbamyl-rodamin 110

N-(N-metyl-N-hexylkarbamyl-rodamin 110

N-(N-metyl-N-oktylkarbamyl-rodamin 110

N-(N-metyl-N-decylkarbamyl-rodamin 110

N-acetyl-rodamin 116

N-metoxykarbonyl-rodamin 116

N-etoxykarbonyl-rodamin 116

N-oktyloxykarbonyl-rodamin 116

N-hexyloxykarbonyl-rodamin 116

N-benzyloxykarbonyl-rodamin 116

N-metansulfonyl-rodamin 116

N-trifluormetansulfonyl-rodamin 116

N-oktansulfonyl-rodamin 116

N-acetyl-rodamin 19

N-etoxykarbonyl-rodamin 19

N-oktyloxykarbonyl-rodamin 19

N-metoxykarbonyl-rodamin 19

N-metansulfonyl-rodamin 19.

Typické arylové skupiny jsou arylové skupiny s C_{6-10} zahrnující fenyl, naftyl, fluorenyl a podobně. Libovolná z nich se může susbtituovat halovou nebo alkylovou skupinou.

Typické alkyly jsou alkyly s C_{1-10} zahrnující metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl, heptyl, oktyl, nonyl, decyl a jejich větvené izoméry.

Typickými acyl (alkanoyl) jsou alkanoyl s C_{2-10} , jako je acetyl, propionyl, butanoyl, hexanoyl a podobně, stejně jako jejich větvené řetězcové izoméry.

Typickými biologicky přijatelnými solemi látek podle vynálezu jsou sole sodíku, draslíku, amonia, TRIS a podobně.

Jisté látky podle vynálezu se mohou vyskytovat v tautomerních formách, zvláště části obecného vzorce I. Vynález zahrnuje všechny takové tautoméry. Vynález také popisuje stereoizoméry, racemické směsi takových stereoizomérů stejně jako jednotlivé entantioméry, které se mohou separovat podle metod, které jsou dobře známy v oboru.

Látky podle vynálezu se mohou připravovat za použití metod dobře známých v oboru. Zvláště látky obecného vzorce I až III se mohou připravovat jak ukazují příklady reakcí schéma 1 až 5.

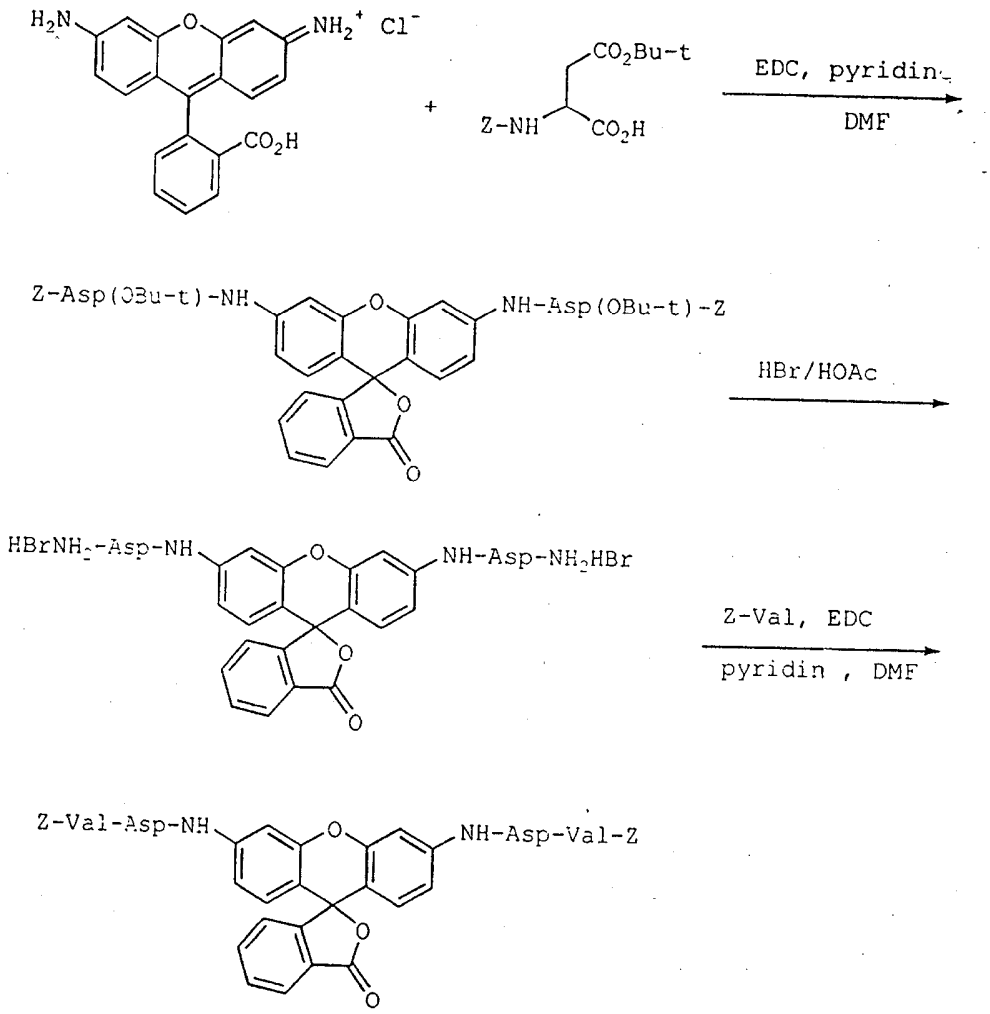
Schéma 1 znázorňuje pereferovaný způsob, protože odstranění ochrany HBr/HOAc vede k odstranění t-butoxyskupiny a benzyloxykarbonylová skupina (Z), která činí další kuplovací reakci složitější. Tam, kde je t-butoxyskupina nutná, musí se

12.06.00

znova zavést. V případě, že se jako ochranná skupina N-konce používá skupina N-(9-fluorenylmetoxykarbonyl)- (fmoc) (schéma 2), může se selektivně odstranit morfolinem, piperidinem nebo jinou aminovou bazí, aniž se odstraní ochranná t-butoxyskupina, což umožní zavedení dalších Z-chráněných aminokyselin nebo peptidů (schéma 2 až 4). U konečných Z-chráněných látek se může selektivně odstranit ochrana kyselinou trifluoroctovou (TFA), čímž se odstraní t-butoxyskupina, aniž se odstraní Z skupina.

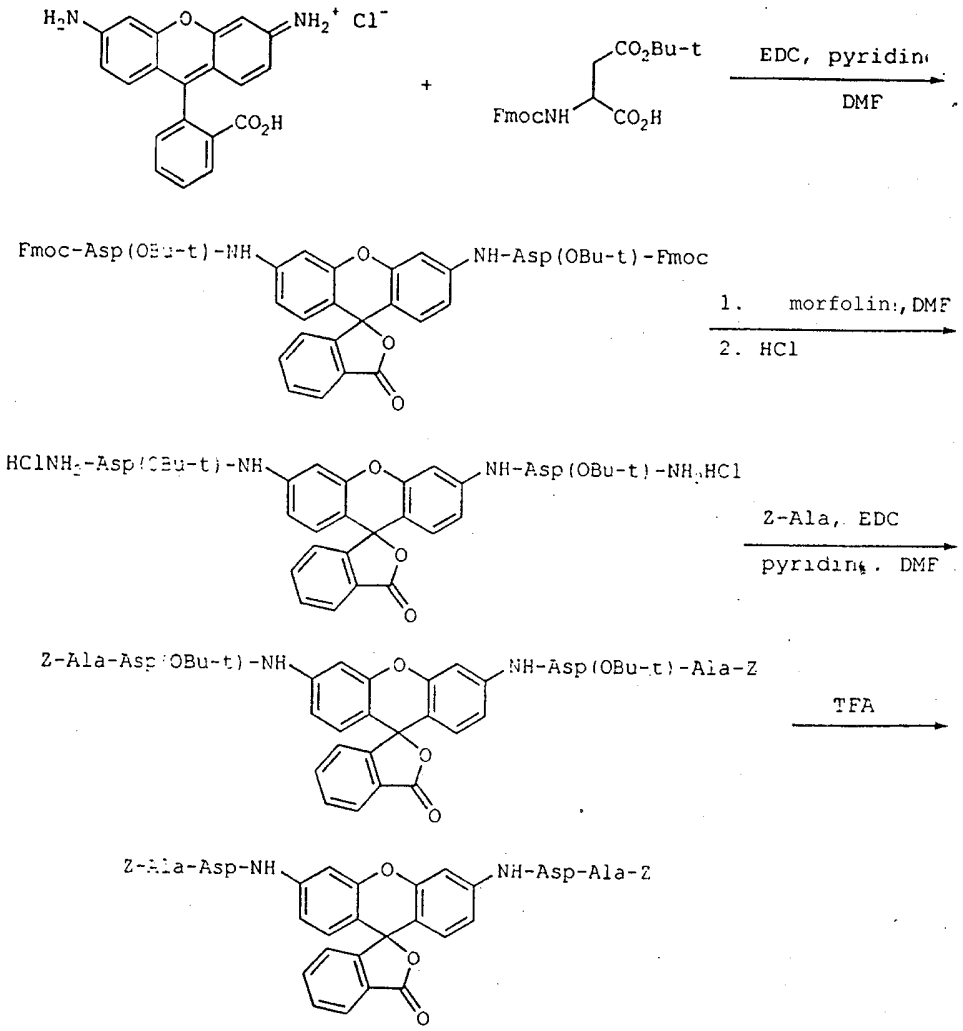
12.06.00

Schéma 1



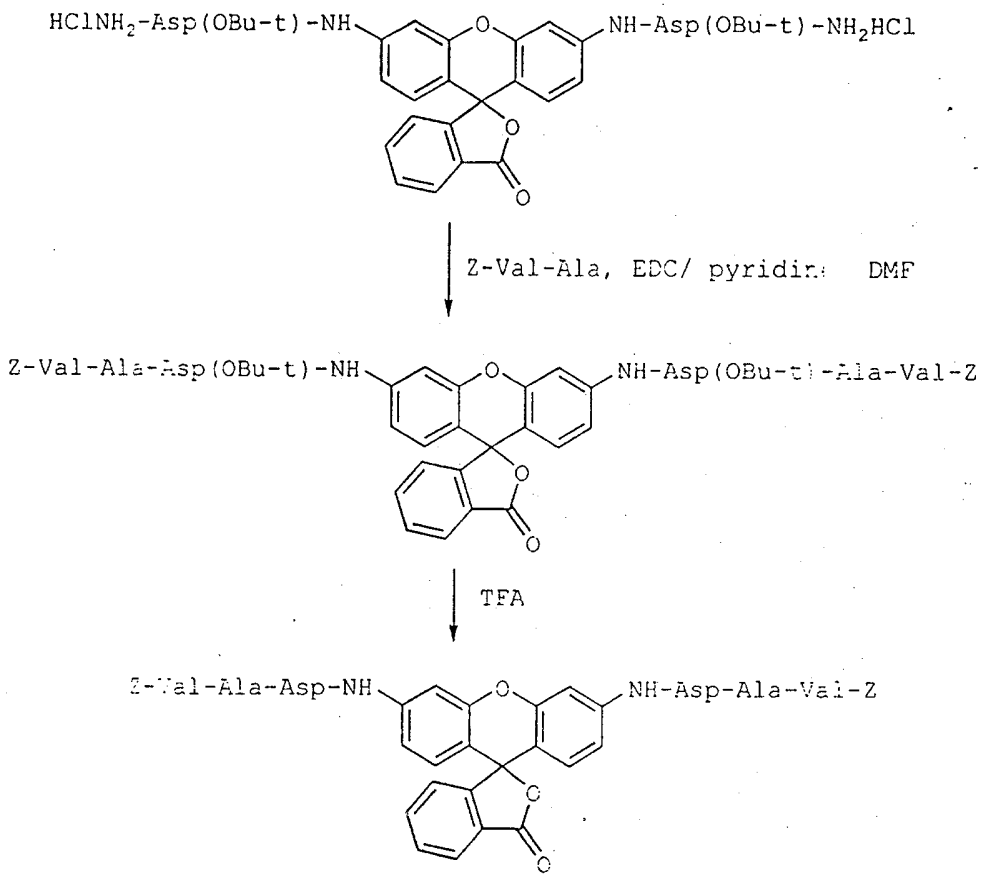
12.08.00

Schéma 2



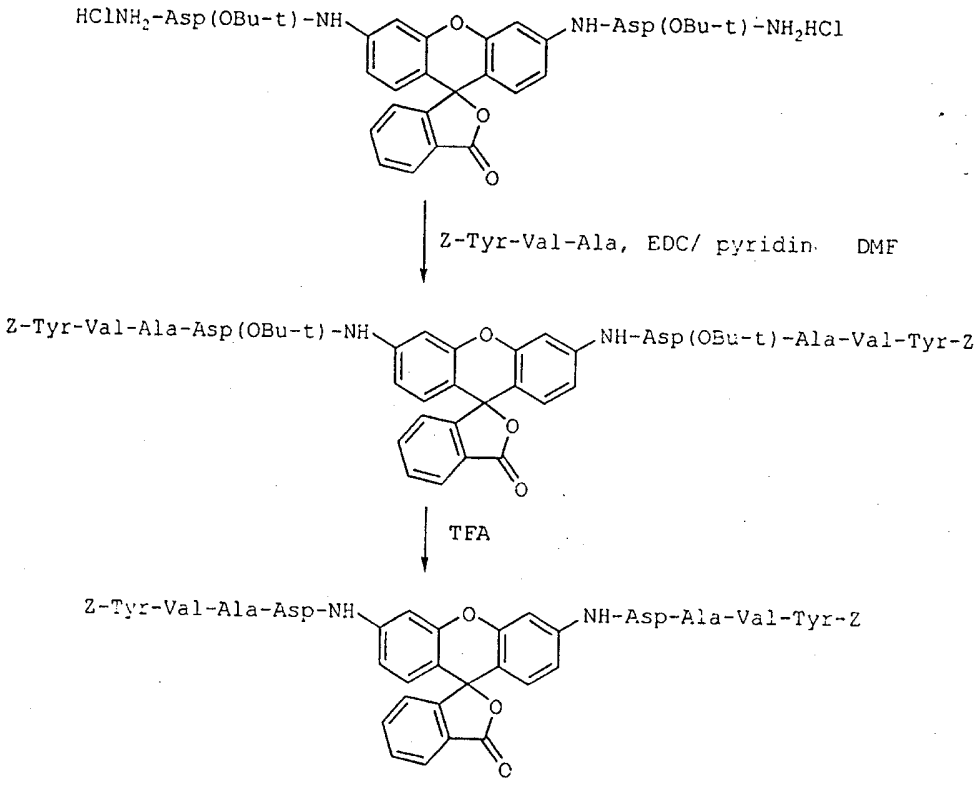
12.06.00

Schéma 3



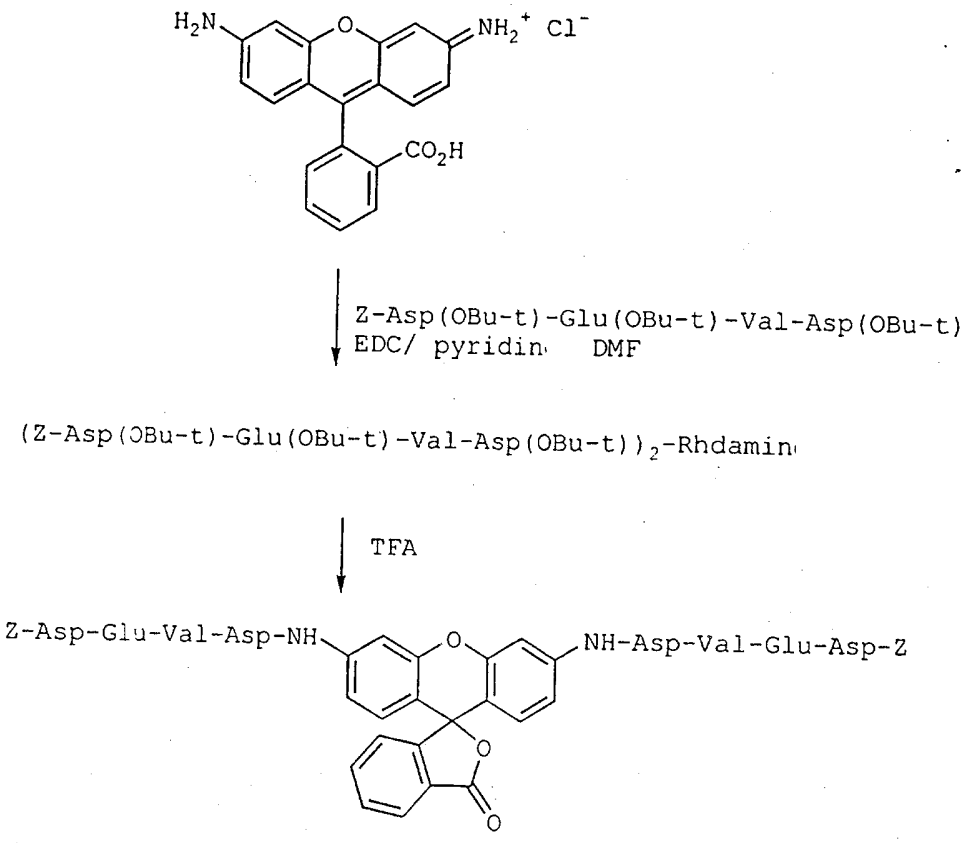
12.06.00

Schéma 4



12.06.00

Schéma 5



Vynález také popisuje způsob přípravy látky obecného vzorce III, zahrnující

(a) kondenzaci rodaminu 110 s β-t-butylesterem kyseliny N-fmoc-L-aspartové za vzniku $(Fmoc\text{-}Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodamin 110,

(b) odstranění skupiny Fmoc za vzniku $(Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodamin 110,

(c) kondenzaci $(Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu 110 s $Z\text{-}(AA)_n$ za vzniku $(Z\text{-}(AA)_n\text{-}Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu 110 a

(d) odstranění chránící skupiny OBu-t.

V preferovaném provedení vynálezu $-(AA)_n$ představuje WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP nebo IET. Kde aminokyselina se substituovala karboxylovou skupinou. Je

12.06.00

chráněna chránící skupinou OBu-t, která se v posledním kroku odstraní.

Kondenzační reakce probíhá za použití běžného kondenzačního činidla, které se používá při syntéza peptidu. V preferovaném provedení vynálezu kondenzační činidlo je 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimid (EDC) nebo 2-etoxy-1-etoxykarbonyl-1,2-dihydrochinolin (EEDQ). Při reakci se jako rozpouštědlo může použít pyridin nebo dimetylformamid (DMF). Reakce v obecném případě probíhá při teplotě místnosti. Poměr kondenzačního činidla k rodaminu může být přibližně 10: 1 a poměr chráněné aminokyseliny nebo peptidu k rodaminu nebo k Asp(OBu-t))$_2$-rodamin 110 je také přibližně 10:1.

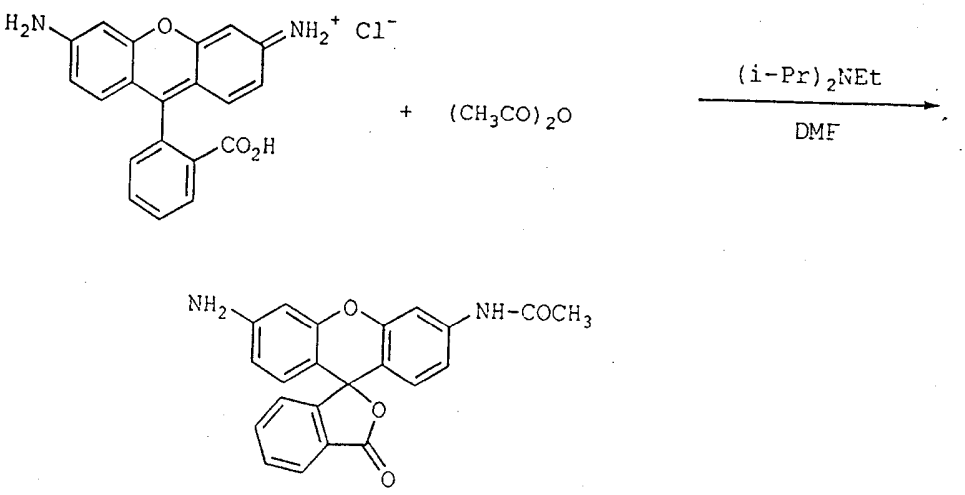
Skupina Fmoc se v obecném případě odstraní ošetřením s morfolinem, piperidinem nebo jinou aminovou bází v polárním aprotickém rozpouštědle, jako je DMF. V obecném případě se morfolin přidá v nadbytku a reakce probíhá při teplotě místnosti. α,α-dimetyl-3,5-dimetoxybenzyloxykarbonyl (Ddz) je jiná chránící skupina N-konce, která se může použít na místě fmoc. Tak β-t-butylester kyseliny N-Ddz-L-aspartové se může použít na místě β-t-butylesteru kyseliny N-fmoc-L-aspartové. Ddz se může selektivně štěpit v přítomnosti t-butoxyskupiny 1% TFA v metylenchloridu.

Skupina OBu-t se odstranila kyselinou trifluoroctovou v aprotickém rozpouštědle, jako je metylenchlorid při teplotě místnosti.

Látký obecného vzorce VI se mohou připravit podle reakce uvedené na schématu 6.

12.06.00

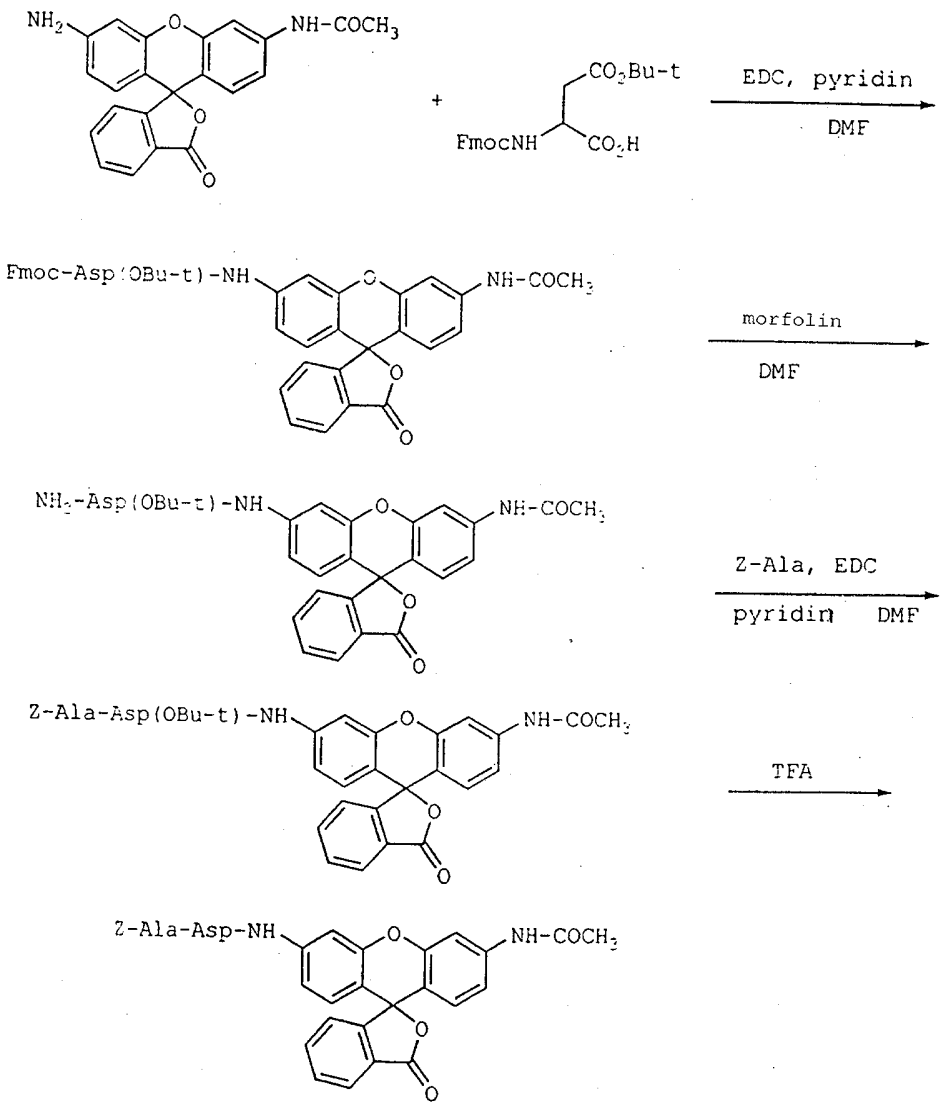
Schéma 6



12.06.00

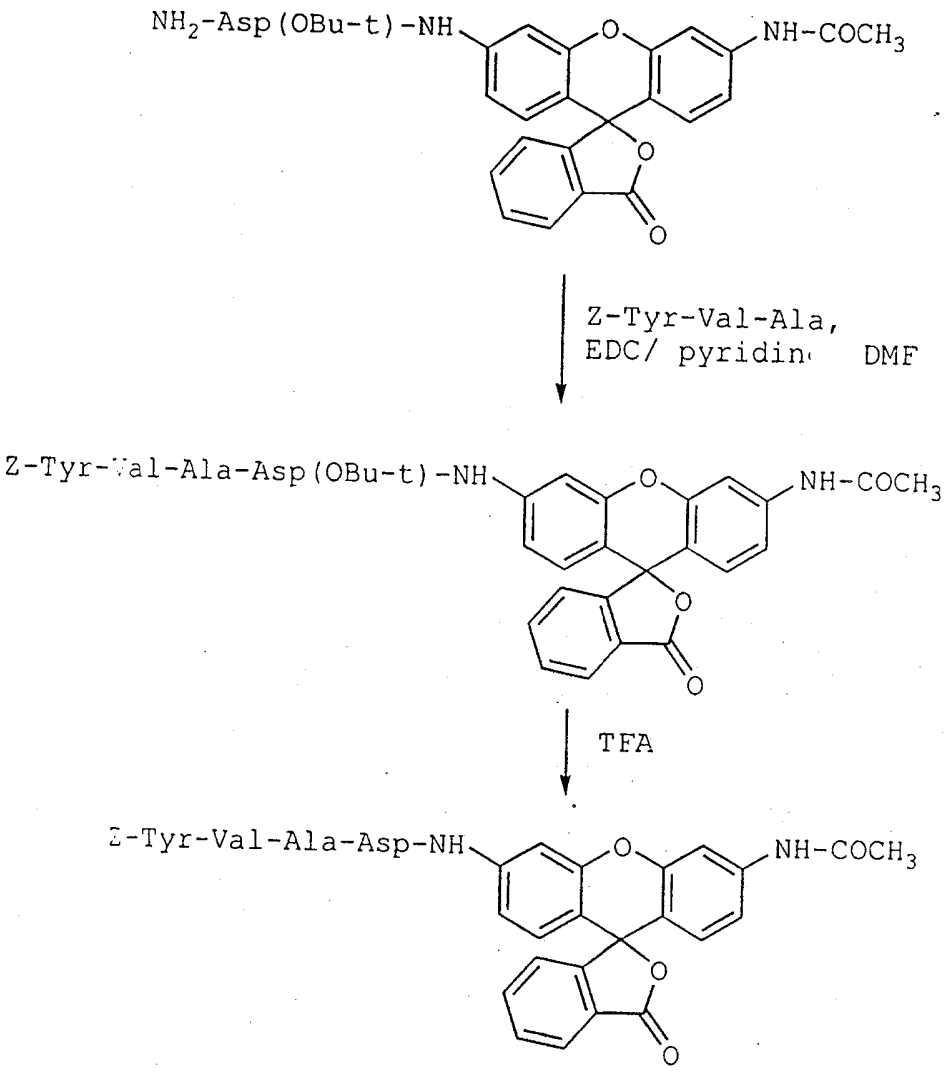
Látky obecného vzorce VII až IX se připravují reakcemi, které jsou uvedeny na schématech 7 až 10.

Schéma 7



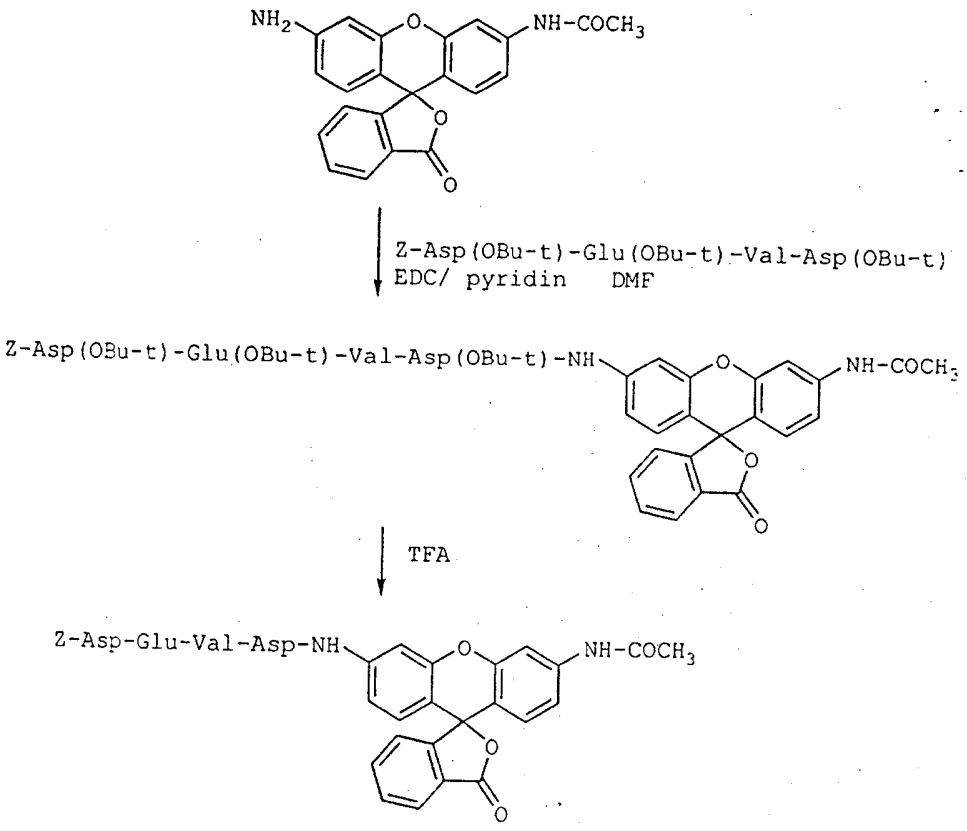
12.06.00

Schéma 8



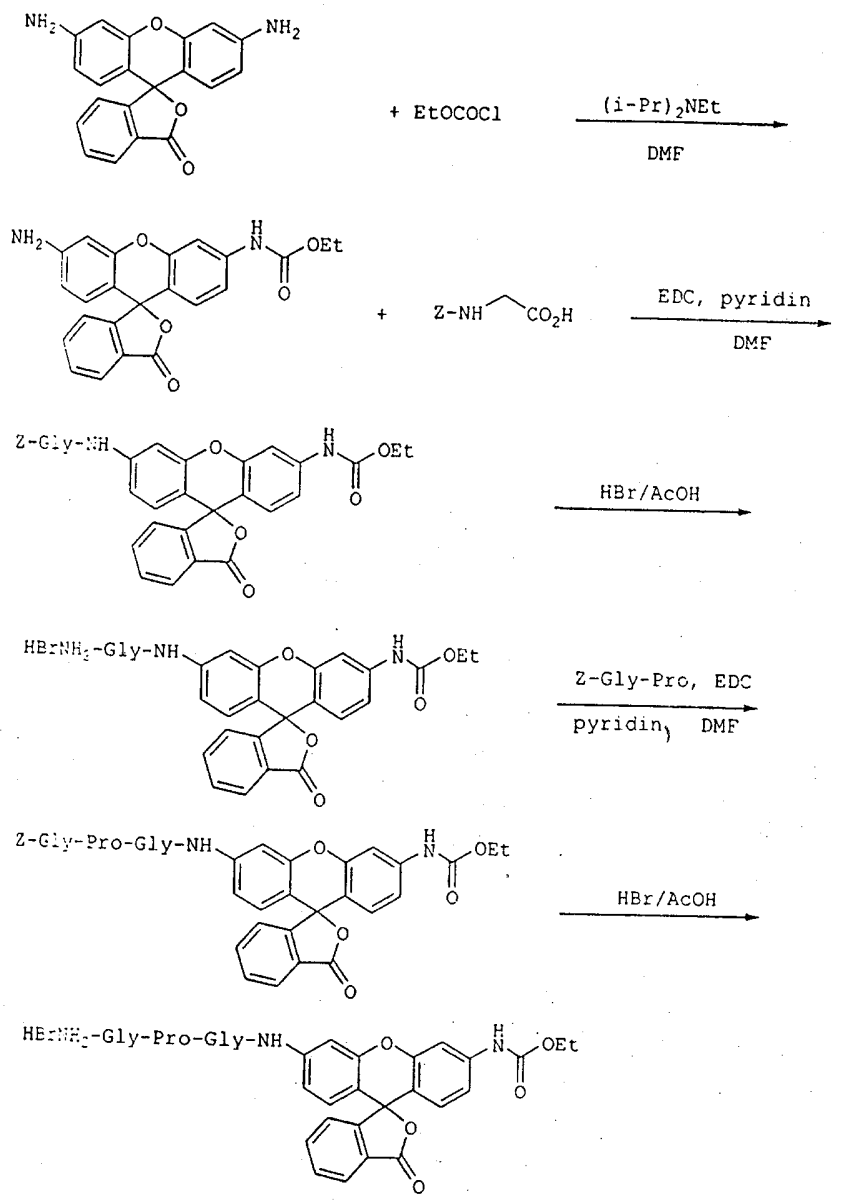
12.06.00

Schéma 9



12.06.00

Schéma 10



Vynález také popisuje způsob přípravy látky obecného vzorce VII, který zahrnuje:

a) reakci rodaminu s anhydridem kyseliny octové za vzniku N-acetyl-rodaminu

12.06.00

b) kondenzaci N-acetyl-rodaminu spolu s β-t-butylesterem kyseliny N-fmoc-L-aspartové za vzniku N-(Fmoc-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu,

c) odstranění skupiny Fmoc za vzniku N-(Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu,

d) kondenzaci N-(Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu s Z-$(AA)_n$, za vzniku N-(Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin a

e) odstranění chránící skupiny OBu-t za vzniku N-(Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu

nebo v jiném případě zahrnuje:

a) reakci rodaminu s anhydridem kyseliny octové za vzniku N-acetyl-rodaminu

b) kondenzace N-acetyl-rodaminu spolu s Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t) za vzniku N-(Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu, a

c) odstranění chránící skupiny OBu-t za vzniku N-(Z-$(AA)_n$-Asp)-N´-acetyl-rodaminu.

V preferovaném provedení vynálezu -$(AA)_n$ je WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP nebo IET.

Látky obecného vzorce VII se také připravují použitím acyl(alkanoyl)chloridu místo anhydridu kyseliny octové. Takovým acylchloridem je acetylchlorid, hexanoylchlorid, oktanoylchlorid a dekanoylchlorid. Místo anhydridu se mohou používat jiná činidla, která zahrnují, ale nejsou omezena na karbamylchlorid, jako je dimetylkarbamylchlorid, dietylkarbamylchlorid a N-metyl-N-hexylkarbamylchlorid, chloroformát, jako je metylchloroformát, etylchloroformát, oktylchloroformát, 2-butoxyetylchloroformát a 2,5,8-trioxadecylchloroformát, chlorothiolformát, jako je metylchlorothioformát, etylchlorothiolformát, oktylchlorothioformát, alkyl-, haloalkyl- a aralalkylsulfonylhalidy, jako je metansulfonylchlorid, aktansulfonylchlorid, trifluormetansulfonylchlorid a tosylchlorid. Reakce probíhá v přítomnosti báze, jako je

12.06.00

$(Et)_3N$, $(i\text{-}Pr)_2$-Net nebo pyridin. Preferované rozpouštědlo je DMF. Reakce v obecném případě probíhá při teplotě místnosti. Poměr anhydridu nebo acylchloridu k rodaminu je přibližně 1:1.

Kondenzační reakce může probíhat za použití libovolného běžného kondenzačního činidla, které se používá při syntéza peptidu. V preferovaném provedení vynálezu kondenzačním činidlem je EDC nebo EEDQ a rozpouštědlo vhodné pro reakci je pyridin nebo dimetylformamid (DMF). Reakce se v obecném případě provádí při teplotě místnosti. Poměr kondenzačního činidla k N-acetyl-rodaminu je přibližně 3:1 a poměr chráněné aminokyseliny nebo peptidu k N-acetyl-rodaminu nebo N-(Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu je přibližně 3:1.

Preferovaným postupem je kondenzace N-acetyl-rodaminu s peptidem, jako je Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t), za vzniku N-(Z-$(AA)_n$-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu v jednostupňové reakci. Látky obencého vzorce VI poskytují fluorescenční barviva, která mohou kondenzovat s libovolným peptidem nebo s jinou strukturou vhodnou pro přípravu fluorogenních nebo fluorescenčních látek, které jsou substráty proteáz nebo peptidáz.

Látky obecného vzorce VII se mohou připravovat nejdříve kondenzací peptidu s rodaminem za vzniku N-peptid-rodaminu, pak reaguje N-peptid-rodamin s acetylanhydridem nebo jiným acetylačním činidlem za vzniku například N-acetyl-N´-peptid-rodaminu. Avšak a) peptidy jsou však obecně daleko dražší než acylchloridy nebo anhydridy, b) kondenzační reakce mezi peptidem a rodaminem není účinnou reakcí. Z těchto důvodů se preferuje připojení peptidu k N-acetyl-rodaminu spíše než připojení acylové skupiny k N-peptid-rodaminu.

Dále vynález popisuje způsob stanovení, zda testovaná látka má účinek na enzym, který se účastní apoptózové kaskády v testované buňce. Tento způsob zahrnuje:

(a) kontakt testované buňky s testovanou látkou a s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy

testovaná látka buď interaguje s externím mebránovým receptorem buňky nebo je buňkou pohlcena a reportní látka je také buňkou pohlcena a

(b) sledování fluorescence v testovaných buňkách, kde změna fluorescence, buď hodnoty nebo vlnové délky, v testované buňce v porovnání s uvedenou kontrolní buňkou, která přišla do kontaktu pouze s reportní látkou a nikoli s testovanou látkou, je indikací, že testovaná látka vykazuje účinek na uvedený enzym.

Výsledky získané uvedenou metodou se mohou porovnat s výsledky získanými s testovanými látkami, které jsou známy, že ovlivňují enzymy, které se účastní apoptózové kaskády v buňkách, přičemž znázorňuje míru relativní účinnosti testované látky. Látky, které se mohou použít, zahrnují známé aktivátory a inhibitory enzymů, které se účastní apoptózové kaskády. Aktivátory, působící buď přímým nebo nepřímým mechanizmem, enzymů, které se účastní apoptózové kaskády, zahrnují, ale nejsou omezeny na známá chemoterapeutická činidla, taková jako je etopozid (Yoon HJ, Choi IY, Kang MR, Kim SS, Muller MT, Spitzner JR, Chung IK (1998), Biochim Biophys Acta 1395:110-120) a doxorubikin (popisuje se v publikaci (Gamen S., Anel A, Lasierra P, Alava MA, Martinez-Lorenzo MJ, Pineiro A, Naval J (1997), FEBS Lett 417: 360-364), které inhibitory topoizomerázy II (Maldonado V, Melendez-Zajgla J, Ortega A (1997), Mutat Res 381:67-75), chlorambucil (Hickman JA. (1992), Cancer Metastasis Rev. 11: 121-139), které je alkylačním činidlem, a fluorouracil, který je metabolit RNA/DNA (Hickman JA. (1992), Cancer Metastasis Rev. 11:121-139). Tyto aktivátory apoptózy se mohou také použít při indukci apoptózy, kdy hledání inhibitoru apoptózy v celých buňkách. Deaktivátory, které působí buď přímými nebo nepřímými mechanizmy, enzymů, které se účastní apoptózové kaskády zahrnují, ale nejsou omezeny na endogenní proteiny zahrnující Bcl-2 (Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S (1994),

12.06.00

Am. J. Pathol. 5: 1191-1198), virem produkované činidlo p35 (popisuje se v publikaci Miller LK (1997), J. Cell Physiol. 173: 178-182) a syntetický inhibitor kaspáz Z-VAD-FMK (popisuje se v publikaci An S, Knox KA (1996), FEBS Lett. 386:115-122).

Vynález zvláště popisuje použití reportních látek obecného vzorce I až III, V, VII a VIII v testech s celými buňkami za použití celých buněk nebo vzroků tkáně, u kterých se může indukovat apoptóza, za účelem hledání látek, které inhibují buď přímo nebo nepřímo enzym nebo enzymy zahrnuté v apoptóze (programované odumírání buněk). Očekává se, že tyto testy za použití látek obecného vzorce I až III, V, VII a VIII vedou k objevení nových léků nebo nového použití léků, které zpomalují nebo blokují odumírání buněk za různých klinických podmínek, při kterých dochází ke ztrátě buněk, tkáně nebo celých orgánů.

Reportní látky obecného vzorce I až III, V, VIII a testy podle vynálezu se mohou použít k identifikaci léků, které redukují nebo brání odumírání buněk v nervovém systému (mozek, páteř a periferní nervový systém) za různých stavů ischemie a ekcitotoxicity, které zahrnují, ale nejsou omezeny fokální ischemii způsobující mrtvici a globální ischemii způsobující zástavu srdce. Tyto testy se mohou použít k identifikaci látek, které redukují nebo brání odumírání buněk v nervovém systému způsobeném poraněním (jako je poranění hlavy a poranění páteře), virovou infekcí nebo odumírání nervových buněk způsobené zářením (například při vedlejších účincích způsobených radioterapií zhoubného bujení) nebo toxicitou prostředí (například působením jistých halogenovaných uhlovodíků). Tyto testy se mohou také použít při identifikaci inhibitorů odumírání buněk, které se mohou použít při redukci nebo prevenci odumírání buněk při neurodegenerativních poruchách, které zahrnují, ale nejsou omezeny na Alzheimerovu nemoc, Huntingtonovu nemoc, Parkinsonovu nemoc, roztroušenou

sklerózu, amyotrofní laterální sklerózu a spinobulbární atrofii.

Testy podle vynálezu se mohou použít k identifikaci látek, které brání odumírání buněk za libovolných podmínek, které vedou k odumírání srdečního svalstva. Tyto poruchy zahrnují infarkt myokardu, městnavé srdeční selhání a kardiomyopatie. Jeden způsob aplikace testu je identifikace látek, které redukují nebo brání odumírání buněk myokardia, které se vyskytují při jistých virových infekcích srdce.

Testy podle vynálezu se mohou použít při identifikaci látek, které brání odumírání buněk retinálních neuronů, které se objevují při poruchách spojených se zvyšujícím se nitroočním tlakem (jako je zelený zákal) nebo poruch sítnice spojených s procesem stárnutí (jako je degenerace makuly spojená se stárnutím). Tyto testy se mohou použít k identifikaci látek, které léčí dědičné degenerativní poruchy sítnice, jako je pigmentová zvrhlost sítnice.

Testy podle vynálezu se mohou také použít k identifikaci inhibitorů odumírání buněk, které se mohou použít při redukci nebo prevenci odumírání nezralých buněk v imunním systému a jsou zvláště použitelné při identifikaci inhibitorů, které jsou použitelné při léčbě poruch imunitní nedostatečnosti, jako je syndrom získaného selhání imunity (AIDS), syndrom těžkého kombinovaného selhání imunitního systému (SCIDS) a příbuzné onemocnění. Testy podle vynálezu se mohou také používat k identifikaci inhibitorů odumírání buněk, které se mohou použít při léčbě potlačení imunity vyvolané radiací.

Testy podle vynálezu se mohou také použít k identifikaci léků použitelných při transplantacích orgánů. Transplantace lidských orgánů a tkání je běžná léčba při selhání orgánů. Během procesu transplantace je však darovaný orgán nebo tkáň riskantní pro odumírání buněk, protože je zbaven normálního zásobování krví před tím, než se implantuje hostiteli. Toto ischemické stádium se dá ošetřit inhibitory odumírání buněk

12.06.00

infuzí do donorového orgánu nebo tkáně nebo přímým přidáním inhibitorů odumírání buněk do kultivačního média, ve kterém se uchovává orgán nebo tkáň. Takové inhibitory odumírání buněk se mohou identifikovat za použití testů podle vynálezu. Inhibitory odumírání buněk se mohou také použít při redukci a prevenci odumírání buněk v darovaném orgánu nebo tkáni po jeho transplantaci, aby se předešlo účinkům imunitních buněk hostitele, které usmrcují své cíle vyvoláním apoptózy. Testy podle vynálezu se mohou použít při identifikaci inhibitorů odumírání buněk použitelných při ochraně transplantovaných orgánů před odmítnutím. Cytoprotektivní účinky inhibitorů odumírání buněk se mohou také využít při prevenci odumírání lidského nebo zvířecího spermatu a vajíček používaných při postupu *in vitro* oplodnění. Tyto inhibitory se mohou použít během postupu sklizně a mohou se také přidat do média vhodného pro uchovávání. Inhibitory odumírání buněk použitelné při aplikacích v procesech fertilizace se mohou identifikovat za použití testovacích metod podle vynálezu.

Savčí buněčné linie a buňky kvasinek se mohou běžně použít při produkci velkého množství rekombinantních proteinů (jako jsou protilátky, enzymy nebo hormony) pro použití v průmyslu nebo v medicíně. Životnost některých uvedených buněčných linií je omezena podmínkami růstu, podstatou exprimovaných rekombinantních molekul (některé jsou toxické) a jinými neznámými faktory. Životnost některých průmyslově využitelných buněných linií lze prodloužit přidáním inhibitorů odumírání buněk do kultivačního média. Inhibitory odumírání buněk použitelné při prodloužení životnosti buněčných linií je možné identifikovat použitím testů podle vynálezu.

Faktory regulující růst a ztrátu vlasů nejsou známy. Existují některé důkazy avšak regrese vlasových folikul (katagen) může být způsobena, alespoň částečně, apoptózou. Proto je možné, že inhibitory odumírání buněk se mohou použít při léčbě ztráty vlasů, která se objevuje při různých stavech,

12.06.00

které zahrnují, ale nejsou omezeny na mužskou holohlavost, ztrátu vlasů vyvolanou radiací nebo chemoterapií a ztrátu vlasů způsobenou emociálním stresem. Existuje také důkaz, že apoptóza může hrát roli při ztrátě barvy vlasů. Proto je možné, že inhibitory odumírání buněk se mohou také použít při léčbě případů předčasného šedivění. Inhibitory buněčného odumírání použitelné při léčbě nebo prevenci ztráty vlasů nebo šedivění vlasů se mohou identifikovat za použití testu podle vynálezu.

Odumírání epiteliálních buněk kůže se může objevit po ozáření, silném zahřátí nebo aplikaci chemikálií. Je možné, že inhibitory odumírání buněk se mohou použít při redukci nebo prevenci tohoto typu poškození buněk. Při jedné aplikaci inhibitory odumírání buněk se mohou aplikovat v podobě masti při léčbě akutních slunečních spálenin a při prevenci tvorby puchýřů a loupání kůže. Inhibitory odumírání buněk, které je možné použít při léčbě a prevenci odumírání buněk kůže se mohou identifikovat za použití testů podle vynálezu.

Vynález dále popisuje použití reportních látek obecného vzorce I až III, V, VII a VIII v testu s celými buňkami za použití živých nebo mrtvých celých buněk nebo vzorků tkáně při testování látek, které stimulují buď přímo nebo nepřímo enzym nebo enzymy, které se podílí na apoptóze. Očekává se, že testy používající látky obecného vzorce I až III, V, VII a VIII povedou k objevení nových léků nebo nového použití známých léků, které působí proti zhoubnému bujení při onemocnění, jako je zhoubné bujení, nádory a buněčné hyperplazie atd. Látky, které se mohou identifikovat za použití testů a činidel podle vynálezu je možné použít při léčbě zhoubného bujení, nádorů nebo hyperplázií tkáně, které zahrnují, ale nejsou však omezeny na zhoubné bujení nebo nádory mozku, periferního nervového systému, očí, uší, nosu, úst, mandlí, zubů, jícnu, plic, srdce, krve, krevních cév, kostní dřeně, lymfatických žláz, brzlíku, sleziny, imunitního systému, jater, žaludku,

12.06.00

střev, pankreasu, endokrinních žláz a tkáně ledvin, močového měchýře, reprodukčních orgánů a žláz, kloubů, kostí a kůže.

Vynález dále popisuje použití reportních látek obecného vzorce I až III, V, VIII v testech s celými buňkami za použití kvasinek nebo jiných hub a bakterií k testování knihoven látek pro léky, které působí proti houbám nebo proti bakteriím. Tyto látky působí tak, že indukují buď přímo nebo nepřímo kaspázovou kaskádu nebo jiné enzymy, které se účastní apoptózy v těchto buňkách.

Dále vynález popisuje použití reportních látek obecného vzorce I až III, V, VII a VIII při monitorování terapeutických účinků terapeutických činidel při léčbě aplikované pacientům s cílem redukovat, předcházet a léčit onemocnění, kde apoptické odumírání buněk je příčinou nebo důsledek.

Dále vynález popisuje použití reportních látek obecného vzorce IX při testování proteázových inhibitorů v buňkách infikovaných HIV, které zahrnuje:

a) kontakt testované buňky s testovanou látkou a s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy testovaná látka buď interaguje s receptorem externí membrány nebo je buňkou pohlcena a reportní látka je pohlcena buňkou a

b) zaznamenávání fluorescence testované buňky, kde změna fluorescence buď hodnoty nebo vlnové délky v testované buňce v porovnání s kontrolní buňkou, která přišla do kontaktu pouze s reportní látkou a nikoli s testovanou látkou, ukazuje, že testovaná látka má inhibční účinek na proteázu HIV.

Vynález dále popisuje použití reportních látek obecného vzorce IX při diagnostice infekce HIV, které zahrnuje

a) kontakt testované buňky pocházející z jedince, který je pravděpodobně infikován HIV, s reportní látkou podle vynálezu za podmínek, kdy reportní látka je pohlcena buňkou a

12.06.00

b) sledování testované buňky, kde změna fluorescence, buď hodnoty nebo vlnové délky, v testované buňce ve srovnání s kontrolní buňkou, která přišla do kontaktu s reportní látkou, je indikací, že uvedená testovaná buňka se infikovala virem HIV a že také jednotlivec je infikován HIV.

Při aplikaci stejného postupu při testování inhibitorů proteáz HIV v buňkách infikovaných HIV se mohou použít reportní látky obecného vzorce IX podle vynálezu k testování inhibitorů adenovirové proteázy v buňkách infikovaných adenovirem. Reportní látky obecného vzorce IX podle vynálezu se mohou použít k testování inhibitorů proteáz viru herpes simplex typ 1 (HSV-1) v buňkách infikovaných HSV-1. Reportní látky se také mohou použít při testování inhibitorů proteáz lidského cytomegaloviru (HCMV) v buňkách infikovaných HCMV. Dále se mohou použít při testování inhibitorů proteáz viru hepatitidy C (HCV) v buňkách infikovaných HCV a k testování inhibitorů DPP-IV v T-buňkách stejně jako k testování inhibitorů aminopeptidázy methioninu typu 2 (MetAP-2) v endoteliálních buňkách.

Navíc při použití stejného postupu při diagnostice infekcí HIV reportní látky obecného vzorce IX podle vynálezu se mohou použít při diagnostikování adenoviru, viru herpes simplex typ-1, lidského cytomegaloviru a viru hepatitidy C.

Kompozice podle vynálezu zahrnuje všechny kompozice, kde fluorogenní nebo fluorescenční látky podle vynálezu jsou obsaženy v množství, které je účinné k dosažení daného účelu. Zatímco množství může kolísat od testu k testu, odborník může stanovit optimální rozmezí účinného množství každého komponentu. V typickém případě fluorogenní nebo fluorescenční substrátové látky se mohou aplikovat na buňky nebo buněčné linie ze savců, například lidí nebo jiných zvířat inkubací buněk nebo tkáně obsahující buňky s fluorogenním nebo fluorescenčním substrátem při přibližné koncentraci 0,01 nM až

12.06.00

1 M nebo s ekvivalentním množstvím sole nebo její reportní molekuly ve fyziologicky kompatibilním pufru. Takové pufry zahrnují buněčná kultivační média. Příkladem je médium vhodné pro buňky získané z leukémie, což je RPMI-1640 s 10 % fetálním bovinním sérem nebo bez něho. Jiné známé pufry vhodné pro inkubaci buněk mohou zahrnovat izotonické roztoky pufrované buď fosforečnanem nebo HEPES. Odborník může rutinními experimenty identifikovat jiné vhodné pufry. Buňky se mohou získat z libovolného orgánu nebo orgánového systému, pro který je nutné získat, použitím testů podle vynálezu, léky, které se mohou použít při léčbě poruch zprostředkovaných apoptózou. Je to například odumírání neuronů, onemocnění srdce, onemocnění jater, poruchy na sítnici, onemocnění ledvin, kloubů nebo kostí, poruchy imunitního systému, rakovina, nádory a hyperplázie tkáně atd.

Vhodné solubilizátory se mohou použít při prezentaci fluorogenních nebo fluorescenčních látek podle vynálezu na tkáně, buňky nebo buněčné linie. Vhodné solubilizéry zahrnují vodné roztoky aktivních látek ve formě rozpustné ve vodě. Jsou to například ve vodě rozpustné sole a alkalické roztoky. Dále se mohou použít v přítomnosti buněk a tkání suspenze látek, jako jsou vhodné olejové suspenze. Vhodné lipofilní rozpouštědla a vehikly zahrnují oleje, jako je například sezamový olej nebo syntetické estery mastných kyselin, jako je například etyloleját nebo triglyceridy nebo polyetylenglykol-400 (látky jsou rozpustné v PEG-400) nebo v dimetylsulfoxid (DMSO) nebo v jiné vhodné rozpouštědlo. V optimálním případě suspenze nebo roztoky mohou také obsahovat stabilizátory. Elektroporace nebo prezentace reportních molekul v lipozomech nebo v detergentech se může použít ke zvýšení prostupnosti buněk fluorogenními nebo fluorescenčními reportními molekulami.

12.06.00

V typickém případě se buňky kontaktují s reportními látkami podle vynálezu a s testovanou látkou po dobu přibližně 30 minut až 5 hodin. Nejvíce se preferuje doba 1 hodiny.

Vynález se také týká pro-reportních derivátů látek podle vynálezu. Takové pro-reportní deriváty zahrnují látky, které se štěpí *in situ* endogenními enzymy za zvniku látek obecného vzorce I až III, V a VII až IX. Takové pro-reportní deriváty zahrnují nižší alkylestery aminokyselinových zbytků, které obsahují karboxylovou skupinu, jako je Asp a Glu. Zvláště preferované pro-reportní deriváty zahrnují metylestery a acetoxymetyl(AM)estery látek obsahujících Asp a Glu.

Následující příklady popisují použití vynálezu při měření aktivity enzymů kaspáz a jiných enzymů, které se účastní při apoptóze buněk a tkání. Příklady demonstrují použití vynálezu při testech léků, které se mohou použít při hledání zesilovačů nebo inhibitorů apoptózy. Tyto příklady popisují způsob a kompozice podle vynálezu. Jiné vhodné modifikace a adaptace různých podmínek a parametrů, které se normálně používají v testech *in vitro*, při testování léků nebo při diagnostice, přičemž tyto metody jsou dobře známy v oboru.

Přehled obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 jsou fotografie buněk HL-60 barvené *N*-oktyloxykarbonyl-rodaminem 110 (obrázek č. 1A), N-decyloxykarbonyl-rodaminem 110 (obrázek č. 1B), N-dodecyloxykarbonyl-rodaminem-110 (obrázek č. 1C), N-hexyloxykarbonyl-rodaminem 110 (obrázek č 1D), N-(etylthio)karbonyl-rodaminem 110 (obrázek č. 1E) a rodaminem 110 (obrázek č. 1F).

Na obrázku č. 2A až 2L je sloupcové grafy štěpení kaspázových substrátů N-Z-VD-N´-etoxykarbonyl-R110, N-Z-EVD-N´-etoxykarbonyl-R110, N-Z-DEVD-N´-etoxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5, N-Ac-DEVD-N´-etoxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5, N-Ac-

12.06.00

DEVD-N´-oktyloxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5, N-Ac-DEVD-N´-hexyloxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5 a N-Z-DEVD-N´-(etylthio)karbonyl-R110 SEQ ID NO: 5 r-kaspázou-3 (obrázek č. 21, 2B, 2D, 2G a 2J) a buněčné lyzáty HL-60 ošetřené vinblastinem (obrázek č. 2C, 2E, 2H a 2K) ve srovnání s kontrolními lyzáty HL-60 (ošetřenými DMSO) (obrázek č. 2F, 2I a 2L).

Obrázky č. 3A až 3E znázorňují fotografie buněk obarvených inkubací s N-Ac-DEVD-N´-oktylkarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5. Do testu se přidaly buňky HL-60 ošetřené vinblastem (obrázek č. 3A) a DMSO (obrázek č. 3B), vinblastem ošetřené buňky s N-Ac-DEVD-CHO SEQ iD NO: 5 (obrázek č. 3C), Jurkatovy buňky ošetřené antiFas (obrázek č. 3D) a PBS (obrázek č. 3E).

Obrázek č. 4 znázorňuje graf ukazující výsledky testu štěpení N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5 Jurkatovými buňkami ošetřenými antiFas a PBS.

Obrázek č. 5 znázorňuje sloupcový graf znázorňující výsledky testu štěpení N-Ac-LEVD-N´-etoxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5 kaspázou-3, -6, -7 a -8.

Obrázek č. 6 znázorňuje sloupcový graf s výsledky testu štěpení N-Z-G-N´-oktyloxykarbonyl-R110 a N-G-N´-oktyloxykarbonyl-R110 pomocí lyzátu buněk HL-60.

Obrázek č. 7A až B znázorňuje fotografie buněk HL-60 ošetřených N-Z-G-N´-oktyloxykarbonyl-R110 a N-G-N´-oktyloxykarbonyl-R110(B).

Příklady provedení vynálezu:

Příklad 1: $(Fmoc\text{-}Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodamin 110

Do roztoku β-t-butylesteru kyseliny Fmoc-L-aspartové (4,9 g, 11,91 mmol) rozpuštěného v nevodné směsi 1:1 dimetylformamidu a pyridinu (30 ml) při teplotě 0 °C se přidá EDC (2,28 g, 11,91 mmol). Roztok se míchá po dobu 45 minut a pak se přidá roztok rodaminu 110 HCl (0,44 g, 1,19 mmol) ve

12.06.00

stejném rozpouštědle (2 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 60 hodin a její koncentrace se zvýšila v podmínkách vakua na přibližně 10 ml. Zbytek se pak ředil 100 ml vody a extrahoval se etylacetátem (3 x 50 ml). Organická fáze se promyla 1N HCl (2 x 50 ml) a vodou (2 x 50 ml). Roztok se sušil na Na_2SO_4 a jeho koncentrace se zvýšila. Tak vznikl surový produkt, který se čistil kolonovou chromatografií (CH_2Cl_2/EtOAc 10:1) a vzniklo 0,89 g (67 %) látky uvedené v názvu příkladu. Jde o bezbarvou, pevnou látku. Teplota tání je 156 až 158 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,75 (bs, 2 H), 8,02 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,80-6,70 (m, 26H), 6,12 (bs, 2H), 4,64 (bs, 2H), 4,46 (d, J=6,8 Hz, 4H), 4,22 (t, J=6,8 Hz, 2H), 2,82 (m, 4H), 1,45 (s, 18H).

Příklad 2: (Asp(OBu-t))$_2$-rodamin 110 2HCl

Vychlazený roztok DMF/morfolin (3 ml, 1:1) se přidával po kapkách do míchaného roztoku (Fmoc-Asp(OBu-t))$_2$-rodamin 110 (150 mg, 0,13 mmol) v dimetylformamidu (3 ml). Roztok se míchal po dobu 20 minut a nalil se na vodu s ledem (100 ml) a extrahoval se etylacetátem (2 x 100 ml). Organická fáze se promyla vodou (3 x 100ml) a sušila se na Na_2SO_4. Do roztoku se přidalo 1N HCl v eteru (0,39 ml) a zakoncentroval se za zvniku červené pevné látky. Červená pevná látka se shromáždila a rozpustila se v metanolu (1 ml) a srážela se eterem (50 ml) za vzniku látky uvedené v názvu příkladu (65 mg, 77 %) v podobě červené pevné látky. Bod tání této látky je 200 °C.

Příklad 3: (Z-Ala-Asp(OBu-t))$_2$-rodamin 110

Z benzyloxykarbonyl-L-alaninu (376 mg, 1,69 mmol), EDC (258 mg, 1,35 mmol) a (Asp(OBu-t))$_2$-rodamin 110 2HCl (50 mg, 0,072 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin (10 ml) při teplotě 0 °C se získalo 63 mg (86%) látky uvedené v názvu v podobě pevné látky s bodem tání 124 až 126 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,85 (d, 2 H), 7,90(m, 2H), 7,60 (m, 4H), 7,32 (m,

12.06.00

10H), 7,10 (m, 2H), 6,68 (m, 2H), 5,20 (s, 2H), 5,10 (d, 4H), 4,90 (s, 2H), 4,18 (m, 2H), 2,82 (m, 4H), 1,42 (m, 24 H).

Příklad 4: $(Z\text{-Ala-Asp})_2$-rodamin 110

K chlazenému roztoku (teplota 0 °C) $(Z\text{-Ala-Asp(OBu-t)})_2$-rodamin 110 (41 mg, 0,038 mmol) v metylenchloridu (5 ml) se přidalo 10 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (16 ml). Roztok se zbarvil do oranžova a míchal se při teplotě místnosti po dobu 3 hodin. Odstranilo se rozpouštědlo a surový produkt se čistil kolonovou chromatografií ($EtOAc/CF_3CO_2H$ = 20 : 0,5). Získá se 34 mg (91 %) látky uvedené v názvu vynálezu. ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8,02 (d, J=8,1 Hz, 1H), 7,85 (s, 2H) 7,73 (t, J=7,5 Hz, 2H), 7,34-6,60 (m, 15H), 5,08 (d, 4H), 4,05 (m, 2H), 2,95 (m, 4H), 1,38 (d, J=6,4 Hz, 6H).

Příklad 5: $(Z\text{-Asp(OBu-t)})_2$-rodamin 110

Z β-t-butylesteru kyseliny benzyloxykarbonyl-L-aspartové (4,41, 13,63 mmol), EDC (2,61 g, 13,63 mmol) a rodaminu 110 HCl (0,50 g, 1,36 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin (40 ml) při teplotě 0 °C se získalo 1,09 g (82%) látky uvedené v názvu v podobě pevné látky s bodem tání 127 až 129 °C. ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8,75 (bs, 2 H), 8,06(d, J=6,3 Hz, 2H), 7,68 - 7,56 (m, 4H), 7,40 - 6,60 (m, 15H), 6,12 (bs, 2H), 5,16 (s, 4H), 4,62 (bs, 2H), 2,97 (dd, J1= 17,1 Hz, J2= 3,3 Hz, 2H), 2,69 (dd, J1= 17,3, J2= 6,9 Hz, 2H), 1,44 (s, 18H).

Příklad 6: $(Asp)_2$-rodamin 110 2Hbr

Chlazený roztok 30 % Hbr v kyselině octové (5 ml) se přidal po kapkách do míchaného roztoku $(Z\text{-Asp(OBu-t)})_2$-rodamin 110 (200 mg, 0,21 mmol) v kyselině octové (2 ml). Roztok se míchal při teplotě místnosti po dobu jedné hodiny a jeho koncentrace se zvýšila při podmínkách vakua. Ke zbytku se přidalo 100 ml bezvodého eteru za vzniku červené sraženiny, která se izolovala po centrifugaci za vzniku 118 mg (78 %)

12.06.00

pevné látky. Bod tání této látky je 130 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 10,81 (s, 2 H), 8,35(bs, 6H), 8,05 - 6,79 (m, 10H), 4,25 (bs, 2H), 2,96 (m, 4H).

Příklad 7: (Z-Val-Asp)$_2$-rodamin 110

Z benzyloxykarbonyl-L-alaninu (628 mg, 2,5 mmol), EDC (383 mg, 2 mmol) a (Asp)$_2$-rodamin 110 2HBr (72 mg, 0,1 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin (12 ml) při teplotě 0 °C se získalo 38 mg (37%) látky uvedené v názvu v podobě pevné látky s bodem tání 169 až 171 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,70 (d, 2 H), 8,04(d, J´7,5 Hz, 1H), 7,80 (m, 2H), 7,48-7,20 (m, 11H), 7,05 (m, 2H), 5,02 (m, 2H), 4,70 (m, 2H), 3,8 (t, 2H), 3,20 (m, 2H), 2,60 (m, 2H), 2,05 (bs, 2H), 0,85 (t, 12 H).

Příklad 8: (Z-Val-Ala-Asp)$_2$-rodamin 110

Z benzyloxykarbonyl-L-Val-L-Ala (200 mg, 0,62 mmol), EDC (110 mg, 0,57 mmol) a ((Asp(OBu-t)$_2$-rodamin 110 2HCr (31 mg, 0,043 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin při teplotě 0 °C se získalo 45 mg (85%) látky uvedené v názvu v podobě pevné látky s bodem tání 85 až 87 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,10 (bs, 1 H), 8,90(bs, 1H), 8,80 (d, 1H), 7,80-6,60 (m, 19H), 5,42 (bs, 2H), 5,10 (bs, 4H), 4,90 (s, 2H), 4,00 (d, 2H), 2,90 (m, 4H), 2,12 (m, 2H), 1,35 (s, 18H), 1,30 (d, J=6,4 Hz, 6 H), 0,92 (m, 12H).

Příklad 9: (Z-Val-Ala-Asp)$_2$-rodamin 110

Z (Z-Ala-Asp(OBu-t))$_2$-rodamin 110 (28 mg, 0,022 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (30 ml při teplotě 0°C se získalo 23 mg (88 %) látky uvedené v názvu příkladu. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,00 (s, 1H), 7,92 (bs, 1H) 7,86 (bs, 1H), 7,70 (m, 2H), 7,40-7,21 (m, 13H), 6,70 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 5,08 (d, 4H), 4,22 (m, 2H), 3,90 (m, 2H), 2,92 (m, 4H), 2,06 (m, 2H), 1,34 (d, J= 6,4 Hz, 6H), 0,95 (m, 12H).

12.06.00

Příklad 10: (Z-Tyr-Val-Ala-Asp)$_2$-rodamin 110 SEQ ID NO: 2

Z benzyloxykarbonyl-L-Tyr-L-Val-L-Ala (339 mg, 0,70 mmol), EDC (122 mg, 0,64 mmol) a ((Asp(OBu-t)$_2$-rodamin 110 2HCl (39 mg, 0,058 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin při teplotě 0 °C se získalo 61 mg (65%) látky uvedené v názvu v podobě pevné látky s bodem tání 155 až 157 °C. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,02-6,60 (m, 28 H), 5,02 (bs, 4H), 4,92 (t, 2H), 4,80 (t, 2H), 4,38 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 3,05-2,62 (m, 8H), 2,02 (m, 2H), 1,42 (s, 18H), 1,32 (d, J=6,6 Hz, 6H), 0,92 (m, 12H).

Příklad 11: (Z-Tyr-Val-Ala-Asp)$_2$-rodamin 110 SEQ ID NO: 2

Z (Z-Tyr-Val-Ala-Asp(OBu-t))$_2$-rodamin 110 SEQ ID NO: 2 (47 mg, 0,029 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (30 ml) při teplotě 0°C se získalo 36 mg (82 %) látky uvedené v názvu příkladu. Bod tání je 115 °C. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,02 (bs, 2H), 7,82 (bs, 2H), 7,70 (m, 2H), 7,40-6,60 (m, 22H), 5,02 (bs, 4H), 4,80 (m, 2H), 4,38 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 4,10 (m, 2H), 3,10-2,60 (m, 6H), 2,06 (m, 2H), 1,36 (d, J= 7,2 Hz, 6H), 0,91 (m, J=7,5 Hz, 12H).

Příklad 12: N-acetyl-rodamin 110

K roztoku rodaminu 110 (500 mg, 1,36 mmol) rozpuštěném v DMF (20 ml) při teplotě 0°C se přidal N,N-diizopropyletylamin (176 mg, 1,36 mmol) a pak se po kapkách přidával anhydrid kyseliny octové (167 mg, 1,64 mmol). Reakční směs se míchala při teplotě místnosti po dobu 24 hodin a pak se zředila 100 ml vody a extrahovala se etylacetátem (3 x 50 ml). Organická fáze se promyla vodou (2 x 100 ml), sušila se na Na_2SO_4 a zakoncentrovala se za vzniku surového produktu, který se čistil kolonovou chromatografií (hexan/EtOAc 1:1) za vzniku 210 mg (41 %) látky uvedené v názvu příkladu. Látka je ve formě bezbarvé pevné látky a teplota tání je 179 °C. R_f= 0,36 (EtOAc/CH_2Cl_2= 1:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,00 (d, J=6,7 Hz,

12.06.00

1H), 7,78-7,52 (m, 4H), 7,14 (d, J= 6,7 Hz, 1H), 6,93 (d, 6,7 Hz, 1H), 6,64 (d, J=7,9 Hz, 1H), 6,54-6,28 (m, 3H), 3,86 (bs, 2H), 2,15 (s, 3H).

Příklad 13: N-(Fmoc-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin 110

Z t-butylesteru kyseliny Fmoc-L-aspartové (739 mg, 1,79 mmol), EDC (302 mg, 1,57 mmol) a N-acetyl-rodaminu 110 (160 mg, 0,43 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin (8 ml) při teplotě 0 °C se získalo 276 mg (84 %) látky uvedené v názvu v podobě pevné a bezbarvé látky. R_f= 0,75 (EtOAc/CH_2Cl_2= 1:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,72 (bs, 1H), 8,02 (d, J= 6,3 Hz, 1H), 7,80-6,68 (m, 17H), 6,12 (bs, 1H), 4,63 (bs, 1H), 4,47 (d, J= 5,5 Hz, 2H), 4,22 (t, J= 7,2 Hz, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,68 (m, 1H), 2,20 (s, 3H), 1,46 (s, 9H).

Příklad 14: N-(Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin 110

Z chlazeného roztoku DMF/morfolin (3 ml, 1:1) a N-(Fmoc-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu 110 (100 mg, 0,13 mmol) se získala látka uvedená v názvu příkladu (67 mg, 95 %) jako pevná látka. Teplota tání je 131 až 133 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,73 (s, 1H), 8,01 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,70-6,65 (m, 9H), 3,80 (m, 1H), 2,88 (d, J= 16,5 Hz, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,17 (s, 3H), 1,90 (bs, 2H), 1,44 (s, 9H).

Příklad 15: N-(Z-Ala-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin 110

Z benzyloxykarbonyl-L-alaninu (43 mg, 0,19 mmol), EDC (37 mg, 0,19 mmol) a N-Asp(OBu-t)-N´-acetyl-rodamin 110 (30 mg, 0,055 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin při teplotě 0 °C se získalo 38 mg (92%) látky uvedené v názvu příkladu v podobě pevné látky s bodem tání 138 až 140 °C. R_f= 0,42 (EtOAc/hexan 4:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,82 (bs, 1H), 8,01 (d, J= 6,6 Hz, 1H), 7,70-6,67 (m, 14H), 5,20 (m, 1H), 5,16 (bs, 2H), 4,90 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 3,12 (m, 1H), 2,61 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 1,56 (bs, 3H), 1,43 (s, 9H).

12.06.00

Příklad 16: N-(Z-Ala-Asp))-N´-acetyl-rodamin 110

Z N-(Z-Ala-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu 110 (38 mg, 0,052 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylchloridu (3 ml) při teplotě 0 °C se získalo 34 mg (96 %) látky uvedené v názvu příkladu. R_f= 0,6 (10 ml EtOAc s 5 kapkami CF_3CO_2H). ^1H NMR (CD_3OD): δ 8,02 (d, J=7,5 Hz, 1H) 7,80-6,69 (m, 14 H), 5,10 (bs, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,37 (d, J=7,5 Hz, 3H).

Příklad 17: N-(Z-Val-Asp))-N´-acetyl-rodamin 110

Z benzyloxykarbonyl-L-valinu (49 mg, 0,19 mmol), EDC (37 mg, 0,19 mmol) a N-Asp(OBu-t)-N´-acetyl-rodamin 110 (30 mg, 0,055 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin při teplotě 0 °C se získalo 40 mg (94%) látky uvedené v názvu v podobě pevné látky s bodem tání 155 až 17 °C. R_f= 0,5 (EtOAc/hexan 4:1). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8,87 (bs, 1H), 8,01 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 7,64-6,66(m, 14H), 5,32 (bs, 1H), 5,11 (d, J= 3,3 Hz, 2H), 4,92 (m, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,06 (d, J= 1,6 Hz, 1H), 2,62 (m, J=15,8 Hz, 1H), 2,20 (s, 3H), 1,43 (s, 9H), 1,26 (bs, 1H), 0,96 (m, 6H).

Příklad 18: N-(Z-Val-Asp)-N´-acetyl-rodamin 110

Z N-(Z-Val-Asp(OBu-t))-N´-rodamin 110 (40 mg, 0,051 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (3 ml) při teplotě 0°C se získalo 37 mg (99 %) látky uvedené v názvu příkladu. R_f= 0,6 (10 ml EtOAc s 5 kapkami CF_3CO_2H). ^1H NMR (CD_3OD): δ 8,01 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 7,78-6,60 (m, 14H), 5,08 (d, J= 6,5 Hz, 2H), 4,83 (m, 1H), 3,89 (d, J= 5,7 Hz, 1H), 3,02 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,14 (s, 3H), 1,25 (m, 1H), 0,97 (bs, 6H).

Příklad 19: N-(Z-Val-Ala-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin 110

Z benzyloxykarbonyl-L-valin-L-alaninu (63 mg, 0,019 mmol), EDC (37 mg, 0,019 mmol) a N-Asp(OBu-t)-N´-acetyl-rodamin 110

12.06.00

(30 mg, 0,052 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin při teplotě 0 °C se získalo 40 mg (97%) látky uvedené v názvu v podobě pevné látky s bodem tání 101 až 103 °C. R_f= 0,35 (EtOAc/hexan 6:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7,99 (d, J= 8,4 Hz), 7,80-6,62 (m, 14H), 5,42 (m, 1H), 5,11 (bs, 2H), 4,90 (m, 1H), 4,40 (bs, 1H), 4,08 (m, 1H), 3,68 (bs, 2H), 3,50 (m, 1H), 2,90 (m, 2H), 2,16 (bs, 3H), 1,41 (s, 9H), 1,26 (d, J=6,3 Hz, 3H), 1,25 (m, 1H), 0,93 (m, 6H).

Příklad 20: N-(Z-Val-Asp)-N´-acetyl-rodamin 110

Z N-(Z-Val-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin 110 (36 mg, 0,043 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (4 ml) při teplotě 0°C se získalo 35 mg (100 %) látky uvedené v názvu příkladu. R_f= 0,4 (10 ml EtOAc s 4 kapkami CF_3CO_2H). ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,02 (d, J= 5,7 Hz, 1H), 7,95-7,12 (m, 12H), 6,71 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 5,09 (bs, 2H), 4,82 /m, 1H), 4,25 (m, 1H), 3,88 (m, 1H), 3,64 (bs, 1H), 2,94 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,30 (d, J=6,0 Hz, 3H), 0,95 (d, J=6,9 Hz, 6H).

Příklad 21: N-(Z-Tyr-Val-Ala-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 2

Z benzyloxykarbonyl-L-tyrosin-L-valin-L-alaninu (119 mg, 0,25 mmol), EDC (47 mg, 0,25 mmol) a N-Asp(OBu-t)-N´-acetyl-rodamin 110 (30 mg, 0,055 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin při teplotě 0 °C se získalo 50 mg (95%) látky. R_f= 0,5 (EtOAc). ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,02 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 7,82-6,58 (m, 18H), 4,90 (m, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 4,08 (m, 1H), 2,93 (m, 1H), 2,73 (m, 1H), 2,13 (s, 3H), 1,43 (s, 9H), 1,37 (d, J= 7,2 Hz, 3H), 1,29 (bs, 1H), 0,91 (m, 6H).

Příklad 22: N-(Z-Tyr-Val-Ala-Asp)-N´-acetyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 2

Z N-(Z-Tyr-Val-Ala-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 2 (49 mg, 0,049 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové

12.06.00

v metylenchloridu (4 ml) při teplotě 0°C se získalo 42 mg (89 %) látky uvedené v názvu příkladu. R_f= 0,62 (10 ml EtOAc s 5 kapkami CF_3CO_2H). ^1H NMR (CD_3OD): δ 8,02 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 7,84-6,56 (m, 18H), 4,99 (bs, 2H), 4,80 (m, 1H), 4,32 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,10 (m, 1H), 2,97 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 1,37 (d, J= 6,9 Hz, 3H), 1,23 (m, 1H), 0,90 (m, 6H).

Příklad 23: N-(Z-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z benzyloxykarbonyl-L-Asp(OBu-t)-L-Glu(OBu-t)-L-Val-L-Asp(OBu-t) (162 mg, 0,34 mmol), EDC (65 mg, 0,34 mmol) a N-acetyl-rodamin 110 (30 mg, 0,08 mmol) v bezvodé směsi (1 : 1) DMF/pyridin (4 ml) při teplotě 0 °C se získalo 73 mg (81%) látky uvedené v názvu příkladu. Teplota tání je 127 až 129°C. R_f= 0,69 (EtOAc/CH_2Cl_2= 1:1). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 9,05 (s, 1H), 8,79 (d, J= 10,8 Hz, 1H), 8,38 (bs, 1H), 8,01-6,65 (m, 15H), 6,10 (m, 1H), 5,14 (m, 2H), 4,92 (bs, 1H), 4,52 (m, 1H), 4,42 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,10-2,64 (m, 4H), 2,48 (m, 2H), 2,17 (bs, 3H), 1,40 (m, 27H), 0,99 (bs, 6H).

Příklad 24: N-(Z-Asp-Glu-Val-Asp)-N´-acetyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z N-(Z-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-acetyl-rodaminu 110 SEQ ID NO: 5 (49 mg, 0,043 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (5 ml) při teplotě 0°C se získalo 38 mg (92 %) látky uvedené v názvu příkladu. R_f= 0,52 (10 ml EtOAc s 5 kapkami CF_3CO_2H). ^1H NMR (CD_3OD): δ 8,04-6,63 (m, 15H), 5,05 (m, 2H), 4,50 (m, 1H), 4,40 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,93 (d, J= 7,9 Hz, 1H), 3,10-2,61 (m, 4H), 2,37 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 0,97 (m, 6H).

Příklad 25: N-etoxykarbonyl-rodamin 110

K roztoku rodaminu 110 (3,00 g, 8,18 mmol) rozpuštěném v dimetylformamidu (140 ml) při teplotě -50 °C se přidal N,N-

12.06.00

diizopropyletylamin (1,27 g, 1,2 mmol), pak se přidal po kapkách etylchloroformát (1,07 g, 9,81 mmol). Reakční roztok se pak pomalu zahříval na teplotu místnosti a uchovával se za stálého míchání po dobu 5 hodin. Pak se ředil 200 ml vodou chlazenou ledem a extrahoval se s etylacetátem (3 x 50 ml). Organická fáze se promyla vodou (3 x 100 ml), sušila se na Na_2SO_4 a koncentrovala se za vzniku surového produktu, který se čistil kolonovou chromatografií (hexan/EtOAc 3:1) za vzniku 1,31 g (40 %) látky uvedené v názvu příkladu ve formě bezbarvé a pevné látky. R_f= 0,4 (EtOAc/hexan= 2:1). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8,00 (d, J= 6,9 Hz, 1H), 7,65-7,50 (m, 4H), 7,15 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 6,88-6,32 (m, 8H), 4,24 (q, J= 7,2 Hz, 2H), 3,92 (bs, 2H), 1,33 (t, J= 7,2 Hz, 3H).

Příklad 26: N-(Cbz-Val-Asp(OBu-t))-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110

Z Cbz-Val-Asp(OBu-t) (197 mg, 0,47 mmol), EDC (89,53 mg, 0,47 mmol) a N-etoxykarbonyl-rodamin 110 (47 mg, 0,12 mmol) (jak se popisuje v příkladu 1) se získalo 47 mg (50%) látky uvedené v názvu příkladu v podobě pevné látky. ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 9,04 (bs, 1H), 8,00 (d, J=6,9 Hz, 1H), 7,82-6,62 (m, 15H), 5,30 (bs, 1H), 5,20-5,11 (m, 2H), 4,98 (m, 1H), 4,23 (q, J= 6,9 Hz, 2H), 3,74 (t, 1H), 3,15 (d, J= 16,5 Hz, 1H), 2,59 (m, 1H), 2,10 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,32 (t, J= 6,9 Hz, 3H), 1,01 (m, 6H).

Příklad 27: N-(Cbz-Val-Asp)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110

Z N-(Z-Val-Asp(OBu-t))-N´-etoxykarbonyl-rodaminu 110 (20 mg, 0,025 mmol) v 50 % kyselině trifluoroctové v metylenchloridu (2 ml) se získalo 15 mg (80 %) látky uvedené v názvu příkladu. ^1H NMR (CD_3OD): δ 8,02 (d, J=6,6 Hz, 1H), 7,86-6,59 (m, 14H), 5,10 (m, 2H), 4,97 (m, 1H), 4,20 (q, J= 6,9 Hz, 2H), 3,77 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,76 (m, 1H), 2,00 (m, 1H), 1,32 (t, J= 7,2 Hz, 3H), 1,02 (m, 6H).

12.06.00

Příklad 28: N-(Cbz-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z Cbz-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t) SEQ ID NO: 5 (374 mg, 0,48 mmol), EDC (92 mg, 0,48 mmol) a N-etoxykarbonyl-rodaminu 110 (48,28 mg, 0,12 mmol) (jak se popisuje v příkladu 1) se získalo 81 mg (58%) látky uvedené v názvu příkladu v podobě pevné látky. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,02 (bs, 1H), 8,80 (d, 1H), 8,00-6,78 (m, 15H), 6,18-6,02 (m, 1H), 5,13 (bs, 2H), 4,94 (bs, 1H), 4,60 (bs, 1H), 4,44 (bs, 1H), 4,22 (m, 2H), 3,89 (m, 1H), 3,15-2,00 (m, 8H), 1,46-1,31 (m, 27H), 1,26 (m, 1H), 1,05-0,98 (m, 9H).

Příklad 29: : N-(Cbz-Asp-Glu-Val-Asp)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z N-(Z-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-etoxykarbonyl-rodaminu 110 SEQ ID NO: 5 (100 mg, 0,086 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (3 ml) (jak se popisuje v příkladu 4) se získalo 85 mg (99 %) látky uvedené v názvu příkladu. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,02-6,63 (m, 15H), 5,08-5,04 (d, 2H), 4,48-3,92 (m, 6H), 3,10-1,95 (m, 8H), 1,31 (t, J= 7,2 Hz, 3H), 1,05-0,96 (m, 9H).

Příklad 30: N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t) SEQ ID NO: 5 (307,6 mg, 0,45 mmol), EDC (86 mg, 0,45 mmol) a N-etoxykarbonyl-rodaminu 110 (60 mg, 0,15 mmol) (jak se popisuje v příkladu 1) se získalo 128 mg (80%) látky uvedené v názvu příkladu v podobě pevné látky. R_f= 0,35 ($EtOAc/CH_2Cl_2$). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,00 (d, J= 7,5 Hz), 8,80-8,54 (m, 2H), 8,05-6,90 (m, 9H), 6,72 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 4,93-4,02 (m, 6H), 3,09-2,30 (m, 6H), 2,10 (s, 3H), 2,05 (m, 2H), 1,48-1,30 (m, 29H), 1,06-0,96 (m, 6H).

12.06.00

Příklad 31: N-(Ac-Asp-Glu-Val-Asp)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-etoxykarbonyl-rodaminu 110 SEQ ID NO: 5 (90 mg, 0,084 mmol) a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (2 ml) se získalo 65 mg (86 %) látky uvedené v názvu příkladu. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,12-7,26 (m, 9H), 7,21 (d, J-7,2 Hz, 1H), 7,08-7,05 (m, 1H), 6,79-6,64 (m, 2H), 4,67 (m, 1H), 4,40 (m, 1H), 4,20 (q, J= 6,9 Hz, 2H), 4,07-3,52 (m, 2H), 3,07-2,68 (m, 4H), 2,38 (m, 2H), 2,13 (m, 2H), 1,98-1,94 (t, 3H), 1,32 (t, J= 6,9 Hz, 3H), 1,04-0,9 (m, 6H).

Příklad 32: N-oktyloxykarbonyl-rodamin 110

Z rodaminu 110 (500 mg, 1,36 mmol), N,N-diizopropyletylaminu (351,6 mg, 2,76 mmol) a oktylchloroformátu (316 mg, 1,64 mmol) (jak se popisuje v příkladu 25) se získalo 182 mg (28 %) látky uvedené v názvu příkladu jako bezbarvá a pevná látka. R_f= 0,7 (EtOAc/hexan 1:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7,99 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 7,65-7,56 (m, 2H), 7,52 (bs, 1H), 7,15 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 6,88-6,32 (m, 6H), 4,17 (t, J= 6,6 Hz, 2H), 3,9 (2H), 1,68 (m, 2H), 1,42-1,26 (m, 8H), 0,89 (t, J= 6,3 Ha, 3H).

Příklad 33: N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t) SEQ ID NO: 5 (123,7 mg, 0,18 mmol), EDC (34,5 mg, 0,18 mmol) a N-oktyloxykarbonyl-rodaminu 110 (29 mg, 0,06 mmol) (jak se popisuje v příkladu 1) se získalo 43 mg (62%) látky uvedené v názvu příkladu v podobě pevné látky. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,01-8,53 (m, 3H), 8,07-7,99 (m, 1H), 7,77-6,78 (m, 9H), 6,72 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 4,93 (m, 1H), 4,76-4,64 (m, 1H), 4,39 (m, 1H), 4,16 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 3,08-2,02 (m, 9H), 2,10 (s,

12.06.00

3H) 1,47-1,29 (m, 39H), 1,05-0,96 (m, 6H), 0,88 (t, J= 5,7 Hz, 3H).

Příklad 34: N-(Ac-Asp-Glu-Val-Asp)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z N-(Z-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-oktyloxykarbonyl-rodaminu 110 SEQ ID NO: 5 a 50 % kyseliny trifluoroctové v metylenchloridu (2 ml) se získalo 16,5 mg (100 %) látky uvedené v názvu příkladu. R_f= 0,46 (10 ml EtOAc s 5 kapkami CF_3CO_2H). ^1H NMR (CD_3OD): δ 8,02-7,04 (m, 8H), 6,79-6,64 (m, 2H), 4,67 (m, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,40 (m, 1H), 4,15 (t, J=6,6 Hz, 2H), 4,15-3,94 m, 2H), 3,10- 2,10 (m, 6H), 2,01-1,94 (m, 3H), 1,69 (m, 2H), 1,29 (bs, 10H), 1,05-0,86 (m, 9H).

Příklad 35: N-metoxykarbonyl-rodamin 110

Z rodaminu 110 (600 mg, 1,64 mmol), N,N-diizopropyletylaminu (254 mg, 1,96 mmol) a metylchloroformátu (201 mg, 2,13 mmol) (jak se popisuje v příkladu 25) se získalo 28 mg (4,4 %) látky uvedené v názvu příkladu jako bezbarvá a pevná látka. R_f= 0,77 (EtOAc/hexan 3: 1). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8,10-6,53 (m, 9H), 6,35 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 3,90 (bs, 2H), 3,80 (s, 3H).

Příklad 36: N-metylsulfonyl-rodamin 110

Z rodaminu 110 (500 mg, 1,36 mmol), N,N-diizopropyletylaminu (211 mg, 1,64 mmol) a metylsulfonylchloridu (187 mg, 1,64 mmol) (jak se popisuje v příkladu 25) se získalo 42,1 mg (9,4 %) látky uvedené v názvu příkladu. ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8,02 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 7,71-7,62 (m, 3H), 7,24-6,36 (m, 7H), 3,95 (bs, 2H), 3,18 (s, 3H).

Příklad 37: N-acetyl-rodamin 116

12.06.00

Z rodaminu 116 (458,8 mg, 1,0 mmol), N,N-diizopropyletylaminu (129,3 mg, 1,0 mmol) a anhydridu kyseliny octové (122 mg, 1,2 mmol) (jak se popisuje v příkladu 25) se získalo 141 mg (9,4 %) látky uvedené v názvu příkladu ve formě bezbarvé a pevné látky. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,01 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 7,69-7,62 (m, 3H), 7,24-6,36 (m, 7H), 3,95 (bs, 2H), 3,28 (s, 3H), 2,87 (s, 3H), 1,95 (bs, 3H).

Příklad 38: N-dimetylkarbamyl-rodamin 110

Z rodaminu 110 (1,0 g, 2,73 mmol), N,N-diizopropyletylaminu (0,42 g, 3,27 mmol) a dimetylkarbamylchloridu (0,35 g, 3,27 mmol) (jak se popisuje v příkladu 25) se získalo 10 mg (1 %) látky ve formě pevné látky. R_f= 0,3 (EtOAc). ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,00 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 7,80-7,64 (m, 3H), 7,55 (d, J=2,1 Hz, 1H), 7,21-6,40 (m, 6Hú, 3,03 (s, 6H).

Příklad 39: N-hexyloxykarbonyl-rodamin 110

Z rodaminu 110, diizopropyletylaminu (0,24 ml, 2,52 mmol) a hexylchloroformátu (0,27 ml, 1,64 mmol) (jak se popisuje v příkladu 25) se získalo 80 mg (13 %) látky ve formě oranžové pevné látky. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7,99 (d, J= 6,6, 1H), 7,67-7,56 (m, 2H), 7,51 (s, 1H), 7,14 (d, J= 7,5, 1H), 6,87 (dd, J= 1,8, 8,7, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,66 (d, J= 8,7, 1H), 6,54-6,50 (m, 2H), 6,33 (dd, J= 2,1, 8,7, 1H), 4,17 (t, J= 6,6, 2H), 3,92 (s, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,34 (br s, 6H), 0,91 (t, J= 6,0, 3H).

Příklad 40: N-decyloxykarbonyl-rodamin 110

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 25. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7,98 (d, J= 7,2, 1H), 7,67-7,56 (m, 2H), 7,51 (s, 1H), 7,14 (d, J= 7,5, 1H), 6,89-6,87 (m, 2H), 6,66 (d, J= 8,4, 1H), 6,3-6,49 (m, 2H), 6,32 (d, J= 8,4, 1H), 4,17 (t, J= 6,6, 2H), 3,93 (s, 2H), 1,27 (br s, 14H), 0,89 (t, J= 6,9, 3H).

12.06.00

Příklad 41: N-dodecylkarbonyl-rodamin 110

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 25. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,00 (d, J= 6,9, 1H), 7,68-7,57 (m, 2H), 7,51 (s, 1H), 7,16 (d, J= 6,9, 1H), 6,86 (d, J=8,4, 1H), 6,89-6,53 (m, 4H), 6,35 (d, J= 7,1, 1H), 4,17 (t, J= 6,3, 2H), 3,89 (s, 2H), 1,67 (m, 2H), 1,27 (br s, 18H), 0,89 (t, J= 5,7, 3H).

Příklad 42: N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t)-OH SEQ ID NO: 5 (263 mg, 0,383 mmol), EDC (74 mg, 0,39 mmol) a N-hexyloxykarbonyl-rodaminu 110 (44 mg, 0,096 mmol) (podle příkladu 1) se získalo 30 mg (28 %) látky uvedené v názvu příkladu jako bílá pevná látka. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,99 (d, J= 6,9, 1H), 8,78 (d, J= 11,7, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,06-6,69 (m, 13H), 4,97-4,01 (m, 6H), 3,08-2,04 (m, 12H), 1,70-1,34 (m, 39H), 1,04-0,89 (m, 9H).

Příklad 43: N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 1. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,01-8,76 (m, 3H), 8,51 (s, 1H), 8,02-6,69 (m, 13H), 4,97-4,01 (m, 6H), 3,08-2,04 (m, 12H), 1,70-1,34 (m, 47H), 1,04-0,88 (m, 9H).

Příklad 44: N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 1. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,01-8,76 (m, 3H), 8,51 (s, 1H), 8,02-6,69 (m, 13H), 4,97-4,01 (m, 6H), 3,08-2,04 (m, 12H), 1,70-1,34 (m, 51H), 1,04-0,88 (m, 9H).

12.06.00

Příklad 45: N-(Ac-Asp-Glu-Val-Asp)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-hexyloxykarbonyl-rodaminu 110 SEQ ID NO: 5 (30 mg, 0,027 mmol) a kyseliny trifluoroctové (2 ml) se získala látka uvedená v názvu příkladu ve formě žluté a pevné látky (22 mg, 85 %). ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,13-7,32 (m, 8H), 7,26 (d, J= 6,6, 1H), 7,12 (d, J=8,7, 1H), 6,83-6,69 (m, 2H), 4,72 (m, 1H), 4,44-3,99 (m, 5H), 3,11-2,77 (m, 3H), 2,43 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 2,03-1,98 (m, 5H), 1,73 (m, 2H), 1,49-1,34 (m, 8H), 1,04-0,97 (m, 9H).

Příklad 46: N-(Ac-Asp-Glu-Val-Asp)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 45. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,13-7,32 (m, 8H), 7,26 (d, J= 7,8, 1H), 7,12 (d, J=8,1, 1H), 6,83-6,69 (m, 2H), 4,72 (m, 1H), 4,44-3,99 (m, 5H), 3,11-2,77 (m, 3H), 2,45 (m, 2H), 2,22-2,10 (m, 2H), 2,05-1,98 (m, 5H), 1,73 (m, 2H), 1,49-1,26 (m, 14H), 1,06-0,92 (m, 9H).

Příklad 47: N-(Ac-Asp-Glu-Val-Asp)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 45. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,07-7,08 (m, 10H), 6,81-6,68 (m, 2H), 4,73 (m, 1H), 4,44-3,35 (m, 5H), 3,26-2,02 (m, 12H), 1,73 (m, 2H), 1,49-1,29 (m, 18H), 1,06-0,92 (m, 9H).

Příklad 48: N-(etylthio)karbonyl-rodamin 110

K roztoku rodaminu 110 (500 mg, 1,36 mmol) rozpuštěném v dimetylformamidu (12 ml) při teplotě -61 °C se přidal N,N-diizopropyletylamin (264 mg, 2,04 mmol), pak se přidal po kapkách etylchloroformát (204 mg, 1,64 mmol). Reakční roztok se pak pomalu zahříval na teplotu místnosti a uchovával se za stálého míchání po dobu 1 hodiny. Pak se ředil 100 ml vody

12.06.00

chlazené ledem a extrahoval se etylacetátem (3 x 30 ml). Organická fáze se promyla pramenitou vodou (2 x 50 ml), sušila se na Na_2SO_4 a koncentrovala se za vzniku surového produktu, který se čistil kolonovou chromatografií (hexan/EtOAc 2:1) za vzniku 238 mg (42 %) látky uvedené v názvu příkladu ve formě bezbarvé a pevné látky. R_f= 0,6 (EtOAc/hexan= 1:1). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8,01 (d, J= 6,9 Hz, 1H), 7,68-7,57 (m, 3H), 7,21 (bs, 1H), 7,14 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 6,88 (dd, J1= 8,4 Hz, J2= 2,1 Hz, 1H), 6,68 (d, 1H), 6,56-6,50 (m, 2H), 6,34 (dd, J1= 8,4 Hz, J2= 2,1 Hz, 1H), 3,91 (s, 2H), 3,00 (q, J= 7,5 Hz, 2H), 1,36 (t, J= 7,5 Hz, 3H).

Příklad 49: N-(Ac-Asp(OBu-t)-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 1. R_f= 0,56 (EtOAc/ CH_2Cl_2= 2:1). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 9,04-8,46 (m, 3H), 8,01-6,68 (m, 11H), 4,93-3,86 (m, 4H), 3,15-1,85 (m, 8H), 2,14 (d, 3H), 1,48-1,33 (m, 29H), 1,06-0,98 (m, 6H).

Příklad 50: N-(Ac-Asp-Glu-Val-Asp)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 45. ^1H NMR (CD_3OD): δ 8,12-7,09 (m, 11H), 6,79-6,66 (m, 2H), 4,67-3,93 (m, 4H), 3,08-2,68 (m, 6H), 2,38 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 1,99-1,94 (t, 3H), 1,32 (t, J= 7,5 Hz, 3H), 1,04-0,94 (m, 6H).

Příklad 51: 2,5,8-trioxadecylchloroformát

Roztok trietylenglykolmonometyleteru (2 g, 12,2 mmol) v eteru (15 ml) se po kapkách po dobu trvající déle než 20 minut přidával k míchanému, na ledu chlazenému 20 % fosfogenu v toluenu (11,36 ml, 21,92 mmol). Reakční směs umožňovala zahřátí na teplotu místnosti a míchání pokračovalo po dobu 15

12.06.00

hodin. Odpařením rozpouštědla vzniklo 2,63 g (95 %) látky uvedené v názvu příkladu. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 4,44 (m, 2H), 3,37 (m, 2H), 3,68-3,63 (m, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,38 (s, 3H).

Příklad 52: N-(2,5,8-trioxadecyloxykarbonyl)-rodamin 110

Z rodaminu 110 (500 mg, 1,36 mmol), N,N-diizopropyletylaminu (317 mg, 2,45 mmol) a 2,5,8-trioxadecylchloroformátu (371 mg, 1,64 mmol) se získalo 261 mg (37 %) látky uvedené v názvu příkladu ve formě pevné látky. R_f= 0,52 (EtOAc/ hexan= 4:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,00 (d, J=6,6 Hz, 1H), 7,66-7,58 (m, 3H), 7,49 (s, 1H), 7,26 (bs, 1H), 6,88 (d, J= 9,0 Hz, 1H), 6,65 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 6,54-6,31 (m, 3H), 4,33 (t, J= 4,2 Hz, 2H), 3,93 (bs, 2H), 3,74 (t, J= 3,3 Hz, 2H), 3,70-3,64 (m, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,37 (bs, 3H).

Příklad 53: N-(Ac-Leu-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 9

Z Ac-Leu-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t) (189 mg, 0,3 mmol) SEQ ID NO: 9, EDC (57,5 mg, 0,3 mmol) a N-etoxykarbonyl-rodaminu 110 (40 mg, 0,1 mmol) (podle příkladu 1) se získalo 48 mg (47 %) látky uvedené v názvu příkladu jako pevná látka. R_f= 0,35 (EtOAc/ CH_2Cl_2= 1:1). ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,02-7,04, 6,79-6,93 (m, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,20 (q, J= 6,9, 2H), 4,11 (m, 1H), 3,94 (d, J= 6,3 Hz), 3,00-2,65 (m, 2H), 2,30 (bs, 2H), 2,00 (m, 2H), 1,98-1,95 (d, 3H), 1,62-1,28 (m, 25H), 1,04-0,82 (m, 12H).

Příklad 54: : N-(Ac-Leu-Glu-Val-Asp)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 9

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 45. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,40-7,05 (m, 9H), 6,79-6,63 (m, 2H), 4,37 (m, 1H), 4,31 (m, 1H), 4,20 (q, J= 6,9 Hz, 2H), 4,11 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,07-2,68 (m, 2H), 2,38

12.06.00

(m, 2H), 2,08 (m, 2H), 1,99-1,95 (t, 3H), 1,68-1,48 (m, 3H), 1,31 (t, J= 6,9 Hz, 3H), 1,040-0,80 (m, 12H).

Příklad 55: N-(Cbz-Gly-Pro)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110

Z Cbz-Gly-Pro (91,8 mg, 0,3 mmol), EDC (57,5 mg, 0,3 mmol) a N-etoxykarbonyl-rodaminu 110 (40,2 mg, 0,1 mmol) (podle příkladu 1) se získalo 68 mg (98 %) látky uvedené v názvu příkladu jako pevná látka. R_f= 0,6 (EtOAc/ CH_2Cl_2= 4:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,45 (s, 1H), 8,00 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 7,61-6,91 (m, 8H), 6,68-6,63 (m, 2H), 5,69 (bs, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,72 (d, 1H), 4,22 (q, J= 6,9 Hz, 2H), 4,03 (bs, H), 3,58 (1H), 3,43 (m, 1H), 2,49-1,90 (m, 4H), 2,42 (bs, 1H), 2,18-1,95 (m, 3H), 1,31 (t, J= 6,9 Hz, 3H).

Příklad 56: N-(Gly-Pro)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110.Hbr

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,11 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 8,00 (bs, 1H), 7,84-7,72 (m, 3H), 7,32-7,15 (m, 3H), 6,95-6,87 (m, 2H), 4,64 (m, 1H), 4,23 (q, J= 6,9 Hz, 2H), 3,96 (s, 2H), 3,68 (m, 2H), 2,35-2,05 (m, 4H), 1,33 (t, J= 6,9 Hz, 3H).

Příklad 57: 1-hexylchlorothiolformát

Roztok 1-hexanthiolu (3,72 g, 31,5 mmol) v eteru (15 ml) se přidával po kapkách do míchaného, ledem chlazeného roztoku 20 % fosfogenu v toluenu (25 ml, 47 mmol) po dobu více jak 20 minut. Směs se zahřála na teplotu místnosti a míchání pokračovalo po dobu 15 hod. Odpařením rozpouštědla vzniklo 6,1 g (98 %) látky. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 2,96 (t, J= 7,2 Hz, 2H), 1,64-1,24 (m, 8H), 0,91 (t, J= 6,3 Hz, 3H).

Příklad 58: N-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 25. R_f= 0,8 (EtOAc/Hexan = 1:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,00 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 7,65-7,58 (m, 3H), 7,24 (bs, 1H), 7,14 (d, 1H), 6,87 (dd, 1H), 6,68-6,32 (m, 4H), 3,92

12.06.00

(bs, 2H), 2,99 (t, J= 6,9 Hz, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,42 (m, 2h), 1,34-1,26 (m, 4H), 0,90 (t, J= 7,2 Hz, 3H).

Příklad 59: 2-butoxyetanolchloroformát

Z 2-butoxyetanolu (3,72 g, 31,5 mmol) a 20 % fosgenu v toluenu (25 ml, 47 mmol) se získalo 4,51 g (79 %) látky uvedené v nadpise příkladu. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 4,46 (t, 2H), 3,70 (m, 2H), 3,51 (t, J= 6,6 Hz, 1H), 1,56 (m, 2H), 1,40 (m, 2H), 0,94 (t, J= 6,9 Hz, 3H).

Příklad 60: N-(2-butoxyetoxykarbonyl)-rodamin 110

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 25. R_f= 0,58 (EtOAc/Hexan = 1:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,00 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 7,67-7,49 (m, 3H), 7,15 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 6,89-6,32 (m, 6H), 4,34 (m, 2H), 3,91 (bs, 2H), 3,68 (m, 2H) 3,50 (t, J= 6,6 Hz), 1,59 (m, 2H), 1,39 (m, 2H), 0,93 (t, J= 7,2 Hz, 3H).

Příklad 61: N-(Cbz-Asp(OEt)-Glu(OEt)-Val-Asp(OEt))-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5

Z Cbz-Asp(OEt)-Glu(OEt)-Val-Asp(OEt)) SEQ ID NO: 5 (181 mg, 0,3 mmol), EDC (57,5 mg, 0,3 mmol) a N-etoxykarbonyl-rodaminu110 (40 mg, 0,1 mmol) (podle příkladu 1) se získalo 71 mg (72 %) látky uvedené v názvu příkladu jako pevná látka. R_f= 0,3 (EtOAc/ CH_2Cl_2= 4:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,00 (bs, 1H), 8,76 (d, 1H), 8,43 (bs, 1H), 8,14-6,90 (m, 10H), 6,80-6,62 (m, 2H), 5,1-3,8 (m, 6H), 3,2-2,0 (m, 1H), 1,35-1,22 (m, 12H), 1,12-0,84 (m, 7H).

Příklad 62: N-(Ac-Leu-Glu(OBu-t)-Val-Asp(OBu-t))-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 9

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 1. R_f= 0,65 (EtOAc/ CH_2Cl_2 = 1:1). ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,02-7,04 (m, 8H), 6,79-6,93 (m, 2H), 6,20 (bs,

12.06.00

1H), 4,95 (bs, 1H), 4,52-4,20 (m, 5H), 3,15-2,00 (m, 9H), 1,68 (m, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,45 (s, 9H), 1,41-1,29 (m, 12H), 1,18-0,88 (m, 15H).

Příklad 63: N-(Z-Gly)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110

Ze Z-glycinu (284 mg, 1,356 mmol), EDC (260 mg, 1,356 mmol) a N-etoxykarbonyl-rodamin 110 (58 mg, 0,135 mmol) (podle příkladu 1) se získalo 70 mg (83 %) látky uvedené v názvu příkladu jako pevná látka. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,95 (bs, 1H), 7,98 (s, 2H), 7,53 (m, 8H), 7,30 (s, 5H), 7,05 (m, 2H), 6,63 (dd, 2H, J= 8,4, 11,4 Hz), 5,09 (s, 2H), 4,19 (q, 2H, J= 7,5 Hz), 1,27 (t, 3H, J= 7,5 Hz).

Příklad 64: N-Gly-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 Hbr

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 6. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,41 (bs, 1H), 9,20 (s, H), 8,04 (m, 1H), 7,62 (m, 3H), 7,33 (m, 2H), 7,12 (m, 2H), 6,97 (m, 2H), 6,74 (m, 2H), 4,25 (q, 2H, J= 6,9), 1,33 (t, 3H, J= 6,9 Hz).

Příklad 65: N-(Z-Gly-Pro-Gly)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110

Ze Z-glycin-prolinu (315 mg, 1,03 mmol), EDC (197 mg, 1,03 mmol) a N-Gly-N´-etoxykarbonyl-rodaminu 110 (50 mg, 0,103 mmol) (podle příkladu 1) se získalo 70 mg (96 %) látky uvedené v názvu příkladu jako pevná látka. R_f= 0,3 (EtOAc/ CH_2Cl_2= 4:1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9,00 Z Cbz-Asp(OEt)-Glu(OEt)-Val-Asp(OEt)) SEQ ID NO: 5 (181 mg, 0,3 mmol), EDC (57,5 mg, 0,3 mmol) a N-etoxykarbonyl-rodamin 110 (40 mg, 0,1 mmol) (podle příkladu 1) se získalo 71 mg (72 %) látky uvedené v názvu příkladu jako světle žlutá pevná látka. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,97 (bs, 1H), 7,94 (d, 1H, J= 7,8 Hz), 7,77 (d, 1H, J= 15 Hz), 7,52 (m, 4H), 7,32 (s, 5H), 7,22 (m, 2H), 7,15 (m, 2H), 6,64 (m, 1H), 5,92 (bs, 2H), 5,78 (bs, 1H), 5,57 (bs, 1H), 5,09 (s,

12.06.00

2H), 4,95 (m, 2H), 4,74 (m, 2H), 4,16 (m, 2H), 3,62 (m, 1H), 3,46 (m, 1H) 1,98 (m, 4H), 1,26 (m, 3H).

Příklad 66: N-(Gly-Pro-Gly)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 Hbr

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,02 (d, 1H, J= 7,8 Hz), 7,71 (m, 3H), 7,28 (m, 2H), 7,19 (m, 1H), 7,01 (m, 1H), 6,71 (m, 2H), 4,48 (m, 1H), 4,19 (q, 2H, J= 7,2 Hz), 4,05 (m, 2H), 3,94 (m, 2H), 3,61 (m, 2H), 2,12 (m, 4H), 1,30 (t, 3H, J= 7,2 Hz).

Příklad 67: N-hexyl-N-metylkarbamylchlorid

Roztok 0,35 ml $(i\text{-}Pr)_2Net$ v 10 ml dietyleteru se přidal při teplotě 0 °C k fosfogenu (1,06 ml, 1,93 M roztok v toluenu) a N-hexylmetylaminu (0,31 ml, 2,05 mM). Směs se zahřála na teplotu 25 °C a míchání pokračovalo po dobu 14 hod. při teplotě 25 °C. Směs se filtrovala a rozpouštědlo se odstranilo v podmínkách vakua. Produkt se použil bez dalšího čištění v dalším stupni reakce. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 3,42 (m, 2H), 3,07 (s, 3H), 1,59 (m, 2H), 1,31 (m, 6H), 0,90 (m, 3H).

Příklad 68: N-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110

K roztoku rodaminu 110 (0,5 g, 1,36 mmol) v DMF (15 ml) při teplotě 61 °C se přidal N,N-diizopropyletylamin (0,25 ml) a N-hexyl-N-metylkarbamylchlorid v DMF (2,05 mmol). Reakční směs se míchala při teplotě -61 °C po dobu 1 hodiny, pak se zahřála na teplotu místnosti. Reakční směs se dále míchala při teplotě místnosti po dobu 14 hodin a pak se dělila mezi vodný saturovaný roztok NH_4Cl a etylacetát (2 x 50 ml). Organický roztok se promyl pramenitou vodou (100 ml) a sušil se na Na_2SO_4. Odstranilo se rozpouštědlo a surový produkt se čistil chromatografií (hexan : EtOAc, 1:1). Získalo se 115 mg (18%) látky uvedené v názvu příkladu, která je v pevné formě. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7,97 (d, 1H, J= 7,2 Hz), 7,59 (m, 3H), 7,12 (d, 1H, J= 7,5 Hz), 6,85 (dd, 1H, J= 8,4, 2, 1Hz), 6,60 (dd, 2H, J= 5,1, 3,3 Hz), 6,48 (dd, 2H, J= 8,4, 2,1 Hz), 6,31 (dd, 1H, J=

12.06.00

8,4, 2,4 Hz), 3,93 (bs, 2H), 3,33 (t, 2H, J= 6,9 Hz), 2,79 (s, 3H), 1,56 (m, 2H), 1,30 (m, 6H), 0,88 (t, 3H, J= 6,6 Hz).

Příklad 69: N-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 25. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7,99 (bs, 1H, J= 7,5 Hz), 7,59 (m, 3H), 7,11 (dd, 1H, J= 6,9, 0,9 Hz), 6,89 (dd, 1H, J= 8,4, 2,1 Hz), 6,64 (d, 1H, J= 8,4 Hz), 6,48 (dd, 2H, J= 8,4, 2,1 Hz), 6,31 (dd, 1H, J= 8,4, 2,4 Hz), 3?97 (bs, 2H), 2,95 (m, 2H), 1,67 (m, 2H), 1,29 (m, 10 H), 0,88 (t, 3H, J= 6,6 Hz).

Příklad 70: N-(Z-Gly)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 1. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,22 (s, 1H), 7,11 (d, J= 7,5, 1H), 7,04-6,97 (m, 2H), 6,85 (s, 1H), 6,70 (dd, J= 7,5, 7,5, 2H), 5,57 (s, 1H), 5,16 (s, 2H), 4,18 (t, J= 6,6, 2H), 4,01 (d, J= 5,7, 1H), 1,68 (q, J= 6,6, 2H), 1,29 (br s, 10H), 0,89 (t, J= 6,9, 3H).

Příklad 71: N-Gly-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110 Hbr

Látka uvedená v názvu příkladu se připravila způsobem popsaným v příkladu 6. ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8,10 (d, J= 6,9, 1H), 7,93 (d, J= 2,4, 1H), 7,86-7,75 (m, 3H), 7,28-7,24 (m, 2H), 7,11 (dd, J= 2,4, 9,0, 1H), 6,85 (d, J= 9,0, 1H), 6,78 (d, J= 9,0, 1H), 4,20 (t, J= 66, 2H), 3,94 (s, 2H), 1,74 (m, 2H), 1,50-1,30 (br m 10H), 0,94 (t, J= 6,6, 3H).

Příklad 72: Fluorescence a stabilita N-acetyl-rodaminu 110 ve srovnání s rodaminem 110

Aktivita rodaminu 110 a N-acetyl-rodaminu 110 jako fluorescenční části v případě syntetických substrátů se měřila za použití fluorometrického testu. Fluorescenční signál se odečítal na spektrofluorometru nebo na odečítacím zařízení pro

12.06.00

mikrotitrační plotny při excitační vlnové délce 485 a emisi 530. Za použití uvedeného testu se stanovila hodnota relativní fluorescence dvou fluorescenčních částí.

Fluorescence se měřila za použití následujícího pufru: 100 mM HEPES pH 7,5 s 10 % sacharózou, 1 % CHAPS, 5 mM glutathion a 1 až 200 nM testovaná látka. Test pro stanovení stability se provádí při teplotě 37 °C po dobu 2 dní.

Poměr fluorescenčního signálu byl 10,2 (rodamin 110/N-acetyl-rodamin 110) v čase 0 a 10,1 po dvou dnech inkubace při teplotě 37 °C. Výsledky ukazují, že podobně, jako rodamin 110, také N-acetyl-rodamin 110 je stabilní a účinný fluorescenční indikátor.

Příklad 73: Fluorescence modifikovaného barviva rodaminu

Modifikovaná barviva rodaminu se hodnotila za použití běžné spektrometrie a spektrofluorometrie. V případě obou typů analýz se barviva rozpustila buď v metanolu nebo v 50 mM Tris, přičemž konečná koncentrace barviva je v rozmezí 10 nM až 100 μM. Pro každé barvivo se stanovilo absorbanční spektrum při vlnových délkách 200 nm až 700 nm za použití spektrofotometru Beckman DU-7000. Všechna barviva vykazovala maximální absorbanci při vlnové délce okolo 470 až 480 nm. Tato vlnová délka se vybrala jako vlnová délka excitace fluorescence a stanovilo se plné spektrum emise fluorescence za použití spektrofluorometru Hitachi F-2000. V případě každého barviva se dosáhlo maximální emise při vlnové délce okolo 520 nm a intenzita fluorescence se měřila za testovaných podmínek (uvádí se v tabulce č. 1).

Tabulka č. 3 Fluorescence modifikovaných barviv rodaminu

látka	Test. konc. (μM)	Rozpouštědlo	Vlnová délka při maximální ekcitaci	Vlnová délka při maximální emisi	Amplituda signálu

12.06.00

N-oktyloxykarbonyl-rodamin 110	1	MaOH	470	520	850
N-metoxykarbonyl-rodamin 110	0,1	Tris	470	520	254
N-etoxykarbonyl-rodamin 110	1	Tris	485	520	3 070
Rodamin 110	0,01	Tris	490	520	284
N-decyloxykarbonyl-rodamin 110	1	MeOH	475	520	827
N-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110	1	MeOH	480	520	640
N-hexyloxykarbonyl-rodamin 110	0,1	MeOH	465	520	109
N-(etylthio)karbonyl-rodamin 110	1	Tris	490	520	2 430
N-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110	1	MeOH	490	530	650
N-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110	1	MeOH	470	520	471
N-(2-butoxyetoxy)ka	1	Tris	470	520	2 047

12.06.00

rbonyl-rodamin 110					
N-(2,5,8-trioxadecyloxy)karbonyl-rodamin 110	1	Tris	485	520	2 841
N-acetyl-rodamin 116	1	Tris	470	530	644
N-metylsulfonyl-rodamin 110	1	Tris	485	520	988
N-dimetylkarbamyl-rodamin 110	0,1	Tris	490	520	446
N-(N-hexyl-N-metylkarbamyl)-rodamin 110	1	Tris	470	520	1 466

Příklad 74: Pohlcení a retence upravených barviv rodaminu buňkami HL-60

Buňky HL-60 se umístily do 5 ml Iscova kultivačního média (bez séra nebo fenolové červeně), které obsahuje 10 μM nebo 50 μM N-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, N-decyloxykarbonyl-rodamin 110, N-dodecyloxykarbonyl-rodamin-110, N-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, N-(etylthio)karbonyl-rodamin 110 nebo rodamin 110. Buňky se inkubovaly po různou dobu při teplotě 37 °C v inkubátoru s atmosférou CO2. Buňky se získaly centrifugací a promyly se 50 ml ledem chlazeným kultivačním médiem. Buňky se centrifugovaly a konečný pelet se opět rozmíchal v 50 μl čerstvého kultivačního média. Alikvoty každé buněčné suspenze se umístily na podložní sklíčka a sledovaly se na inverzním mikroskopu s epifluorescenční iluminací. Na obrázcích č. 1A až 1F jsou zobrazeny buňky HL-60 silně obarvené barvivem N-

12.06.00

oktyloxykarbonyl-rodamin 110(obrázek č. 1A), N-decyloxykarbonyl-rodamin 110 (obrázek č. 1B) a N-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110 (obrázek č. 1C). Nedošlo k podstatnému úniku barviva do média. Buňky HL-60 se barvivem N-hexyloxykarbonyl-rodamin 110 obarvily méně silně (zobrazeno na obrázku č. 1D), ale jsou stále dobře rozeznatelné. Barvivo N-(etylthio)karbonyl-rodamin 110 (na obrázku č. 1E) poskytuje střední, ale stále dobře detekovatelné barvení, ačkoli došlo ke slabému úniku barviva do kultivačního média. Rodaminem 110 (obrázek č. 1F) obarvil buňky rychle, ale barvivo rychle unikalo mimo buňky. Výsledkem je nízká intenzita buněčného barvení a vysoký stupeň fluorescence v kultivačním médiu, které obsahuje buňky. Proto upravená barviva rodaminu jsou lepší než rodamin 110, vzhledem k tomu, že jsou ochotně pohlcovány buňkami HL-60 a zůstávají v buňkách po dobu alespoň 30 minut.

Příklad 75: Enzymatická aktivita susbtrátů

Fluorometrickým enzymatickým testem se měřily aktivity N-(Z-VD)-N´-acetyl-rodaminu 110, N-(Z-VAD)-N´-acetyl-rodaminu 110, N-(Z-VED)-N´-acetyl-rodaminu 110 SEQ ID NO: 5, N-(Z-YVAD)-N-acetyl-rodaminu 110 SEQ ID NO: 2, $(Z\text{-}VAD)_2$-rodaminu 110 a $(Z\text{-}YVAD)_2$-rodaminu 110 SEQ ID NO: 2 jako syntetického substrátu pro rekombinantní CPP32 a ICE. Rekombinantní protein CPP32 a protein ICE se připravil expresí klonů DNA kódujících enzymy v hmyzích hostitelských buňkách (buňky sf9), kdy se jako vektor používají bakuloviry (popisuje se v publikaci Webb, N. R. et al., „Expression of proteins using recombinant Baculovirus," Techniques 2: 173-188 (1990). Štěpení syntetických substrátů enzymem vede k fluorescenčnímu signálu, který se odečítá na spektrofluorometru nebo na fluorometrickém odečítacím zařízení mikrotitračních destiček. Za použití uvedeného testu se stanovily hodnoty K_m a V_{max} pro každý substrát buď enzymem CPP32 nebo ICE.

12.06.00

Štěpení CPP32 a ICE závislé na substrátu se měřilo za použití následujícího pufru: 100 mM HEPES pH 7,5 s 10 % sacahrózou, 1 % CHAPS, 5 mM glutathionu a 1 až 100 μM testovaného substrátu. Nespecifické enzymatické štěpení se stanovilo za použití inhibitorů specifických pro CPP32 a ICE, které obsahují oligomér se sekvencí Asp-Glu-Val-Asp nebo Tyr-Val-Ala-Asp s aldehydovou skupinou spojenou s C-koncem. Test enzymatické aktivity se v typickém příkladě prováděl při teplotě 37 °C po dobu 60 minut.

V Tabulce č. 4 se uvádějí hodnoty K_m a V_{max} pro N-(Z-VD)-N´-acetyl-rodamin 110, N-(Z-VAD)-N´-acetyl-rodamin 110, N-(Z-DEVD)-N´-acetyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 5, N-(Z-YVAD)-N-acetyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 2, $(Z\text{-}VAD)_2$-rodamin 110 a $(Z\text{-}YVAD)_2$-rodamin 110 SEQ ID NO: 2 jako substráty pro CPP32 a ICE.

Tabulka č. 4: Štěpení susbtrátu CPP32 a ICE

	Enzym			
	CPP32		ICE	
	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min)	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min)
N-(Z-VD)-N´-Ac-rodamin 110	60	11	NA	
N-(Z-VAD)-N´-Ac-rodamin 110	NA		70	4
N-(Z-DEVD)-N´-Ac-rodamin 110 SEQ ID NO: 5	154	160	12	9
N-(Z-YVAD)-N´-Ac-rodamin 110 SEQ ID NO: 2	NA		32	96
$(Z\text{-}VAD)_2$-rodamin 110	NA		21	9
$(Z\text{-}VAD)_2$-rodamin 110 SEQ ID NO: 2	NA		6	14

NA= žádná pozorovaná aktivita při koncentraci susbtrátu 1 až 100 μM, při teplotě 37 °C a po 3 hodinách inkubace

Výsledky zobrazené v tabulce č. 4 ukazují, že N-(Z-VD)-N´-Ac-rodamin 110 SEQ ID NO: 5 je účinný substrát pro oba enzymy ICE a CPP32. Také ukazují, že N-(Z-VD)-N´-acetyl-rodamin 110

12.06.00

je účinný susbtrát pro CPP32 a nikoli pro ICE a že N-(Z-VAD)-N´-acetyl-rodamin 110, N-(Z-YVAD)-N´-acetyl-rodamin 110 SEQ ID NO: 2, $(Z\text{-}VAD)_2$-rodamin 110 a $(Z\text{-}YVAD)_2$-rodamin 110 SEQ ID NO: 2 jsou účinné substráty pro enzym ICE nikoli pro enzym CPP32.

Příklad 76: Štěpení substrátů kaspáz-3 rekombinantní lidskou kaspázou-3 a apoptickými lyzáty buněk HL-60.

Kaspázové substráty se testovaly rekombinantní kaspázou-3 a lyzáty připravenými z apoptických buněk HL-60. Testy se probíhaly při teplotě 37 °C na destičkách s 96 prohlubněmi. Objem směsi je 100 µl a obsahuje 30 µl přípravku kaspázy-3 nebo buněčného lyzátu, 10 nebo 50 µM susbtrát a kaspázový testovací pufr (40 mM 1,4-piperazin-bis-etansulfonová kyselina) (PIPES, Aldrich Chemical Company) pH 7,2, 100 mM NaCl, 10 % sacharóza, 0,1 % CHAPS, 1 mM EDTA, 10 mM DTT). Nakonec doby inkubace se měřila fluorescence na odečítacím zařízení pro mikrodestičky za použití ekcitačních a emisních vlnových délek 485 a 530 nm. Současně probíhaly dvě kontrolní měření: 1) vzorek obsahující substrát, ale nikoliv enzym nebo buněčný lyzát, 2) vzorek obsahující inhibitor kaspáz, kterým je Ac-DEVD-CHO (koncentrace 10 µM). Tabulka č. 5 udává souhrn výsledků získaných s těmito substráty.

Tabulka č. 5: Štěpení substrátu kaspázou-3 a lyzáty

látka	Štěpení kaspázou-3	Štěpení apoptickými lyzáty
N-Z-VD-N´-etoxykarbonyl-R110	Slabé	Slabé
N-Z-DEVD-N´-etoxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5	dobré	Dobré
N-Z-EVD-N´-etoxykarbonyl-R110	silné	Silné
N-Ac-DEVD-N´-etoxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5	dobré	Dobré

12.06.00

N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5	dobré	Dobré
N-Ac-DEVD-N´-hexyloxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5	dobré	Dobré
N-Ac-DEVD-N´-(etylthio)karbonyl-R110 SEQ ID NO: 5	dobré	Dobré

Jak ukazuje obrázek č. 2A, štěpení dipeptidového susbtrátu N-Z-VD-N´-etoxykarbonyl-R110 vyžaduje extrémně vysoké koncentrace rekombinantní kaspázy-3 (50-krát větší množství enzymu než je nutné v případě tri- a tetrapeptidového susbtrátu). Dokonce i v přítomnosti tak velkého množství enzymu je signál slabý. Naopak tripeptidový susbtrát N-Z-EVD-N´-etoxykarbonyl-R110 (obrázek č. 2A) a všechny tripeptidové susbtráty (obrázky č. 2B až 2L) se štěpily s vysokou účinností kaspázou-3 a apoptickými lyzáty.

Příklad 77: Barvení apoptických buněk HL-60 substrátem kaspázy-3 N-Ac-DEVD-N´-oktylkarbonyl R110

Schopnost N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5 detekovat aktivaci kaspáz v neporušených buňkách se testovala za použití apoptických buněk HL-60 a Jurkatových buněk. Tyto testy s celými buňkami se provádějí ve dvou fázích: 1) indukce apoptózy, 2) inkubace se substrátem. V případě buněk HL-60 se apopptóza indukovala ošetřením 10 µg/ml vinblastinu po dobu 4 hodin. Kontrolní vzorky se ošetřily DMSO. V případě Jurkatových buněk se apoptóza indukovala ošetřením 500 ng/ml agonistických protilátek anti-Fas po dobu 2 hodin. Kontrolní vzorky se ošetřily PBS. Po indukci apoptózy se buňky inkubovaly 50 µM N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonyl-R110 SEQ ID NO: 5 v pufru vhodném pro kaspázový test (40 mM PIPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 % sacharóza, 1 mM EDTA, 10 mM DTT). Buňky se pak přenesly na skleněné podložní sklíčko a prohlížely se inverzním mikroskopem Nikon s epifluorescenční iluminací. Jak

12.06.00

ukazuje obrázek č. 3A buňky ošetřené vinblastinem se silně obarvily N-Ac-DEVD-N˘-oktyloxykarbonylem R110 SEQ ID NO: 5. Buňky ošetřené DMSO také vykazují obarvení (obrázek č. 3B), ačkoli intenzita signálu je podstatně menší než je u buněk ošetřených vinblastinem. Buňky HL-60 ošetřené 50 μM Ac-DEVD-CHO SEQ ID NO: 5 nevykazují během testu skoro žádný fluorescenční signál (obrázek č. 3), což ukazuje, že obarvení pozorované v buňkách ošetřených vinblastinem je většinou zcela způsobeno štěpením zprostředkované kaspázou. Jurkatovy buňky, u kterých se vyvolala apoptóza pomocí protilátek ant-Fas (obrázek č. 3D) také vykazují silné zbarvení N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonylem R110 SEQ ID NO: 5, zatímco kontrolní buňky vykazují pouze slabé obarvení (obrázek č. 3F). Tyto experimenty ukazují, že N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 5,se může použít při měření apoptózy v neporušených buňkách a že signál získaný v případě N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonylem R110 SEQ ID NO: 5 je závislý na kaspáze.

Příklad 78: Štěpení substrátu kaspázy-3 N-Ac-DEVD-N´-oktylkarbonyl R110 SEQ ID NO: 5 celými apoptickými Jurkatovými buňkami

Za účelem kvantifikovat štěpení N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonylu R110 SEQ ID NO: 5 celými buňkami se provedl test, ve kterém se fluorescenční signál vytvořený z tohoto substrátu apoptickými Jurkatovými buňkami měřil na odečítacím spektrofluorometrickém zařízení v hodném pro destičky. Jurkatovy buňky se inkubovaly po různou dobu na plotnách s 96 prohlubněmi s protilátkami anti-Fas v koncentraci 500 ng/ml za vzniku apoptózy. Kontrolní buňky se inkubovaly v pufru PBS. Nakonec doby ošetření se buňky shromáždily centrifugací ve zkumavce o objemu 1,5 ml a resuspendovaly se v médiu o objemu 25 μl, které obsahuje 1 % FBS. Dále se přidalo 25 μl kaspázového pufru, který obsahuje 50 μM N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 5 a buňky se inkubovaly po

12.06.00

dobu jedné hodiny. Na konec doby inkubace se tři alikvoty o objemu 5 µl odebrané v určitém čase umístily do titračních destiček s 96 prohlubněmi a měřila se fluorescence při vlnové délce ekcitace/emise 485/530 nm. Obrázek č. 4 ukazuje, že buňky ošetřené PBS dávají vzniku slabému fluorescenčnímu signálu, který se během doby ošetření nezesiluje. Avšak buňky ošetřené protilátkami anti-Fas vykazují detekovatelný fluorescenční signál přibližně jednu hodinu po vyvolání apoptózy a signál pokračuje po dobu dvou hodin. Poměr signál k pozadí je 7. Tento experiment ukazuje, že N-Ac-DEVD-N´-oktyloxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 5 způsobuje silný signál v celých apoptických buňkách a může se proto použít ke kvantitativnímu měření apoptózy zprostředkované kaspázou v testu založeném na buňkách.

Příklad 79: Štěpení substrátu kaspázy-8 N-Ac-LEVD-N´-etoxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 9 rekombinantní lidskou kaspázou 3, 6, 7 a 8

N-Ac-LEVD-N´-akrbonyl R110 SEQ ID NO: 9 se testoval rekombinatní lidskou kaspázou-3, 6, 7 a 8. Test se provedl při teplotě 37 °C na destičkách s 96 prohlubněmi při objemu inkubace 100 µl, kde je obsažena rekombinantní lidská kaspáza, 10 µM N-Ac-LEVD-N´-etoxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 9 a pufr vhodný pro kaspázový test (40 mM PIPES, pH 7,2, 100 mM NaCl, 10 % sacharóza, 0,1 % CHAPS, 1 mM EDTA, 10 mM DTT). Na konci doby inkubace se intenzita fluorescence stanovila zařízením odečítajícícm fluorescenci na mikrotitračních destičkách Bio-Tek FL500 za použití vlnových délek ekcitace/emise 485 respektive 530 nm. Za účelem upravit endogenní fluorescenci neštěpeného substrátu, proběhl také kontrolní experiment, který zahrnuje vzorky obsahující 10 µM N-Ac-LEVD-N´-etoxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 9 nikoliv enzym. Další kontroly zahrnují vzorky obsahující kaspázový inhibitor Ac-DEVD-CHO SEQ ID NO: 5. Jak ukazuje obrázek č. 5, kaspáza 6 a kaspáza 8

12.06.00

štěpí N-Ac-LEVD-N´-etoxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 9 za vzniku jednoduše měřitelného fluorescenčního signálu (poměr signál k pozadí je přibližně 13 v případě kaspázy-6 a přibližně 26 v případě kaspázy 8). Kaspáza-3 štěpí N-Ac-LEVD-N´-etoxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 9 s menší účinností. Vzniká signál, který je přibližně 5 krát vyšší než je hodnota kontrolního stanovení, které neobsahuje enzym. Kaspáza-7 nevykazuje žádný signál. Tyto experimenty ukazují, že N-Ac-LEVD-N´-etoxykarbonyl R110 SEQ ID NO: 9 se může štěpit členy podrodiny kaspáz 8 a že se mohou použít ke sledování aktivity tohoto typu kaspáz.

Příklad 80: Štěpení aminopeptidázového susbtrátu N-G-N´-oktyloxykarbonyl R110 lyzátu buněk HL-60

Aminopeptidázy jsou přítomné v mnoha buňkách a postupně z peptidů odstraňují nechráněné aminokyselinové zbytky, což začíná na N-konci. Peptidy s blokavanými amino-konci se neštěpí. Lyzáty HL-60 se připravily homogenizací buněk HL-60 v kaspázovém pufru a schopnost těchto lyzátů štěpit N-Z-G-N´-oktyloxykarbonyl R110 a N-G-N´-oktyloxykarbonyl R110 se testovala v testu na mikrotitračních destičkách. Obrázek č. 6 ukazuje, že lyzáty buněk HL-60 ochotně štěpí N-G-N´-oktyloxykarbonyl R110 a síla signálu závisí na koncentraci substrátu. Naopak žádný signál nevznikl působením lyzátu buněk HL-60 na N-Z-G-N´-oktyloxykarbonyl R110.

Příklad 81: Použití testu fluorescence při testování léků, které stimulují kaspázovou kaskádu.

Léky, které stimulují kaspázovou kaskádu v nepřítomnosti ligandu Fas, se mohou použít například jako chemoterapeutická činidla proti zhoubnému bujení. Test popsaný v příkladu 78 se může použít k testování léků, které stimulují kaspázovou kaskádu v probíhajícím testu za podobných podmínek, jako se popisují v příkladu 78 mimo toho, že známá nebo neznámá látka

12.06.00

vykazující znamou nebo neznámou anti-nádorovou aktivitu nahradí činidlo Fas ligand.

Příklad 82: Použití fluorescenčního testu k testování léků, které inhibují nebo posilují kaspázovou kaskádu stimulovanou ligandem Fas nebo jiným indukčním činidlem apoptózy.

Léky, které inhibují kaspázovou kaskádu jsou použitelné při ošetření degenerativního nebo jiného onemocnění, které je způsobeno nebo je spojeno s neadekvátní aktivací kaspázové kaskády. Léky, které zesilují působení jiného kaspázového stimulátoru, jako je například ligand Fas nebo lék nebo činidlo působící proti zhoubnému bujení může být vhodné k léčbě zhoubného bujení nebo nádorů způsobených nebo spojených s nesprávnou funkcí kaspázové kaskády. Testy a činidla popsaná v tomto vynálezu se mohou použít k testování léků, které buď inhibují nebo zesilují kaspázovou kaskádu v buňkách, provedením testu, jak se popisuje v příkladu 78 za použití ligandu Fas nebo libovolného jiného činidla, které stimuluje kaspázovou kaskádu nebo jinou dráhu apoptózy v přítomnosti testované látky, která inhibuje nebo zesiluje nebo působí synergicky spolu s působením první apoptózy nebo induktoru kaspázové kaskády.

Příklad 83: Použití fluorescenčního testu při testování vzorků rakovinových buněk získaných z pacientů za účelem stanovení chemosenzitivity k lékům proti zhoubnému bujení.

Je známo, že stejné zhoubné bujení u různých pacientů vykazuje velkou rozdílnost při léčbě léky proti zhoubnému bujení. Proto je velmi obtížné předpovědět, dříve než se začne s léčbou, zda zhoubné bujení u pacienta je léčitelné určitým lékem proti zhoubnému bujení. Testy fluorescence popsané v tomto vynálezu umožňují testování chemosenzitivity nebo rezistence zhoubného bujení nebo nádorových buněk nebo vzorků tkáně odebraných jednotlivým pacientům trpícím zhoubným

12.06.00

bujením nebo nádorem vůči lékům. Aby se uskutečnil test chemosenzitivity, fluorescenční test je možné provést za použití rakovinových buněk nebo vzorků tkáně odebraných z pacienta, jak se popisuje v příkladu 78. Použitím uvedeného přístupu se může testovat kapacita stimulace kaspázové kaskády různých léků se známou nebo neznámou chemoterapeutickou aktivitou. Výsledky získané v tomto testu poskytují informace, které se mohou použít k navržení optimálního režimu léčby pacienta chemoterapeutickým lékem.

Příklad 84: Pohlcení a štěpení aminopeptidázového susbtrátu N-G-N´-oktyloxykarbonyl R110 buňkami HL-60

Buňky HL-60 se umístily do Iskova kultivačního média o objemu 5 ml (bez séra nebo bez fenolové červeně), které obsahuje 10 μM N-G-N´-oktyloxykarbonylu R110 nebo 10 μM N-Z-G-N´-oktyloxykarbonylu R110. Tři milióny buněk HL-60 se inkubovaly po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C v inkubátoru s atmosférou CO_2. Buňky se získaly centrifugací a promyly se v 50 μl ledem chlazeného média. Buňky se znova centrifugovaly a konečný pelet se resuspendoval v čertvém médiu o objemu 50 μl. Alikvoty každé buněčné suspenze se nanesly na destičky s 96 prohlubněmi a hodnotily se na odečítacím zařízení na mikrotitračních destičkách Wallac 1420 při vlnové délce ekcitace 485 nm a emise 525 nm. Alikvoty každé buněčné suspenze se také nanesly na podložní sklíčka a prohlížely se na inverzním mikroskopu Nikon s epifluorescenční iluminací. Jak se uvádí v tabulce č. 6, pouze buňky inkubované s 10 μM N-G-N´-oktyloxykarbonylu R110 vykazují signál. Žádný signál nevykazují buňky inkubované s 10 μM N-Z-G-N´-oktyloxykarbonylu R110. Podobně, fluorescenci pod mikroskopem vykazují pouze buňky inkubované s vykazují N-G-N´-oktyloxykarbonylu R110 a žádný fluorescenční signál se nepozoroval u buněk inkubovaných s N-Z-G-N´-oktyloxykarbonylu R110 (obrázky č. 7A až 7B).

12.06.00

Tabulka č. 6: Štěpení N-G-N´-oktylkarbonyl-R110 buňkami HL-60

substrát	Odhad/µg proteinu
N-Z-G-N´-oktyloxykarbonyl R110	0
N-G-N´-oktyloxykarbonylu R110	12,98

12.06.00
PV 2000-1158

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Reportní sloučenina obecného vzorce II:

$$R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp\text{-}y\text{-}Asp\text{-}(AA)_n\text{-}R_1 \qquad (II)$$

nebo její biologicky přijatelná sůl nebo její pro-reportní molekula,

kde R_1 je skupina chránící N-konec,

každé AA nezávisle představuje zbytek α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny nebo derivátu α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny,

každý symbol n má nezávisle hodnotu 0 až 5 a

symbol y je fluorogenní nebo fluorescenční část.

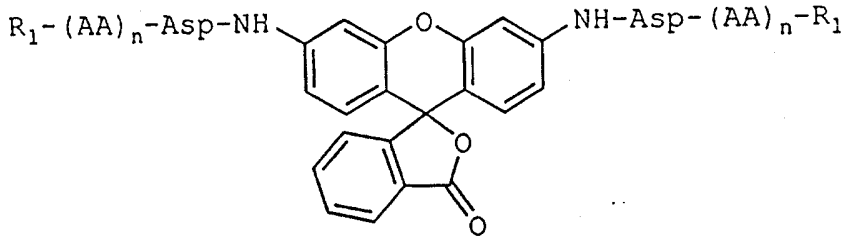
2. Sloučenina podle nároku 1, kde $R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp$ je tetrapeptid s chráněným N-koncem, který je substrátem enzymu kaspázy.
3. Sloučenina podle nároku 2, kde uvedený tetrapeptid je WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, SHVD SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO: 21, VEID SEQ ID NO: 26 nebo IETD SEQ ID NO: 24.
4. Sloučenina podle nároku 1, kde $R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp$ je tetrapetid s chráněným N-koncem, který je substrátem granzymu B.
5. Sloučenina podle nároku 4, kde $R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp$ je IEPD nebo VEPD.
6. Sloučenina podle nároku 1, kde $R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp$ je peptid s chráněným N-koncem obsahující C-terminální Asp a 1, 2 nebo 3 aminokyseliny peptidového řetězce vybraného ze

12.06.00

skupiny zahrnující WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, SHVD SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO: 21, VEID SEQ ID NO: 26 nebo IETD SEQ ID NO: 24, IEPD SEQ ID NO: 23 a VEPD SEQ ID NO: 27.

7. Sloučenina podle nároku 1, kde symbol y představuje rodamin 110 a pro-reportní molekula je nižší alkylester nebo acetoxymetyl(AM) ester sloučeniny obsahující Asp nebo Glu.

8. SLoučenina podle nároku 1 obecného vzorce III:



(III

9. Sloučenina podle nároku 8, kde R_1 je t-butyloxykarbonyl, acetyl, hexanoyl, oktanoyl nebo benzyloxykarbonyl.

10. Sloučenina podle nároku 8, kde $-(AA)_n$ je WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP nebo IET.

11. Sloučenina podle nároku 1, vybraná ze skupiny zahrnující

(Z-YVAD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

(Z-DEVD)$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

(Z-VAD)$_2$-rodamin 110,

(Z-YVAD(OAM))$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

(Z-LE(OAM)HD(OAM))$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 3

(Z-D(OAM)E(OAM)TD(OAM))$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 4

(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

(Z-D(OMe)E(OMe)VD(OAM))$_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5 a

$(Z\text{-}D(OMe)E(OMe)VD)_2$-rodamin 110, SEQ ID NO: 5.

12. Způsob přípravy sloučeniny podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) kondenzaci rodaminu 110 s β-t-butylesterem kyseliny N-fmoc-L-aspartové za vzniku $(Fmoc\text{-}Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu 110,

b) odstranění skupiny Fmoc za vzniku $(Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu 110,

c) kondenzaci $(Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu 110 s $Z\text{-}(AA)_n$ za vzniku $(Z\text{-}(AA)_n\text{-}Asp(OBu\text{-}t))_2$-rodaminu 110 a

d) odstranění chránící skupiny OBu-t.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e $-(AA)_n$ představuje WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP nebo IET.

14. Reportní sloučenina obecného vzorce V:

$$R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp\text{-}y\text{-}R_6 \qquad (V)$$

nebo její biologicky přijatelná sůl nebo její pro-reportní molekula, kde

R_1 je skupina chránící N-konec,

R_6 je chránící skupina, která není aminokyselinou nebo derivátem aminokyseliny,

každé AA nezávisle představuje zbytek α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny nebo derivátu α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny,

každý symbol n má nezávisle hodnotu 0 až 5 a

symbol y je fluorogenní nebo fluorescenční část.

15. Sloučenina podle nároku 14, kde $R_1\text{-}(AA)_n\text{-}Asp$ je tetrapetid s chráněným N-koncem, který je substrátem enzymu kaspázy.

16. Sloučenina podle nároku 15, kde uvedený tetrapeptid je WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, SHVD

12.06.00

SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO: 21, VEID SEQ ID NO: 26 nebo IETD SEQ ID NO: 24.

17. Sloučenina podle nároku 14, kde R_1-$(AA)_n$-Asp je tetrapetid s chráněným N-koncem, který je substrátem granzymu B.

18. Sloučenina podle nároku 17, kde R_1-$(AA)_n$-Asp je IEPD nebo VEPD s chráněným N-koncem.

19. Sloučenina podle nároku 14, kde R_1-$(AA)_n$-Asp je peptid s chráněným N-koncem tvořený C-terminálním Asp a 1, 2 nebo 3 aminokyselinami s peptidovým řetězcem vybraným ze skupiny zahrnující WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO: 2, LEHD SEQ ID NO: 3, DETD SEQ ID NO: 4, DEVD SEQ ID NO: 5, DEHD SEQ ID NO: 6, VEHD SEQ ID NO: 7, LETD SEQ ID NO: 8, LEHD SEQ ID NO: 3, LEVD SEQ ID NO: 9, SHVD SEQ ID NO: 10, DELD SEQ ID NO: 11, DGPD SEQ ID NO: 12, DEPD SEQ ID NO: 13, DGTD SEQ ID NO: 14, DLND SEQ ID NO: 15, DEED SEQ ID NO: 16, DSLD SEQ ID NO: 17, DVPD SEQ ID NO: 18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO: 20, ELPD SEQ ID NO: 21, VEID SEQ ID NO: 26 nebo IETD SEQ ID NO: 24, IEPD SEQ ID NO: 23 a VEPD SEQ ID NO: 27.

20. Sloučenina podle nároku 14, kde symbol y představuje rodamin 110.

21. Sloučenina podle nároku 14, kde R_6 je skupina CH_3OCO-, Cbz, Cl_3CCH_2OCO-, $PhCH_2CH_2OCO$-, nebo $CH_3(CH_2)_pOCO$-, kde symbol p má hodnotu 1 až 11.

22. Sloučenina podle nároku 14, kde R_6 je skupina Me_2NCO-, Et_2NCO- nebo N-Me-N-$CH_3(CH_2)_vNCO$, přičemž symbol v má hodnotu 0 až 9.

23. Sloučenina podle nároku 14, kde R_6 je skupina Ts-, $PhSO_2$-, $MeSO_2$- $PhCH_2SO_2$-, CF_3SO_2- nebo $CH_3(CH_2)_uSO_2$-, přičemž symbol u má hodnotu 0 až 11.

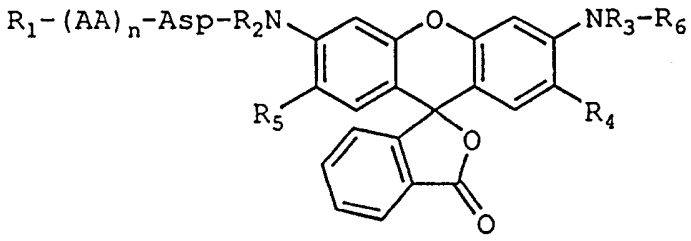
24. Sloučenina podle nároku 14, kde R_6 je skupina CH_3SCO- nebo $CH_3(CH_2)_tSCO$-, přičemž symbol t má hodnotu 0 až 11.

12.06.00

25. Sloučenina podle nároku 14, kde R_6 je skupina HCO-, CH_3CO-, $PhCH_2CO$-, PhCO- nebo $CH_3(CH_2)_wCO$-, přičemž symbol w má hodnotu 0 až 11.

26. Sloučenina podle nároku 14, kde R_6 je skupina $CH_3(OCH_2CH_2)_qOCO$- nebo $CH_3(CH_2)_r(OCH_2CH_2)_sOCO$-, přičemž symbol q má hodnotu 1 až 4, symbol r má hodnotu 0 až 5 a symbol s má hodnotu 1 až 4.

27. Sloučenina podle nároku 14 obecného vzorce VII:



VII

nebo její biologicky přijatelná sůl nebo její pro-reportní molekula, kde

R_2 a R_3 představují nezávisle vodík, metyl nebo etyl a

R_4 a R_5 představují nezávisle vodík nebo metyl.

28. Sloučenina podle nároku 27, kde R_1 je t-butyloxykarbonyl, acetyl, hexanoyl, oktanoyl nebo benzyloxykarbonyl a R_2, R_3, R_4 a R_5 jsou vodík.

29. Sloučenina podle nároku 27, kde $-(AA)_n$ představuje WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, LEV, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP nebo IET.

30. Sloučenina podle nároku 14, vybraná ze skupiny zahrnující

N-(Z-YVAD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 2

N-(Z-DEVD)-N´-acetyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5

N-(Z-VD)-N´-acetyl-rodamin 110,

N-(Z-AD)-N´-acetyl-rodamin 110,

N-(Z-VAD)-N´-acetyl-rodamin 110,

N-(Z-DEVD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5,

N-(Ac-DEVD)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5,

N-(Ac-DEVD)-N´-hexyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5,

N-(Ac-DEVD)-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5,

12.06.00

N-(Ac-DEVD)-N´-decyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5,
N-(Ac-DEVD)-N´-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5 a
N-(Ac-DEVD)-N´-(etylthio)karbonyl-rodamin 110, SEQ ID NO: 5.

31. Způsob přípravy sloučeniny podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) reakci rodaminu s anhydridem kyseliny octové za vzniku *N*-acetyl-rodaminu,

b) kondenzaci *N*-acetyl-rodaminu s β-t-butylesterem kyseliny *N*-fmoc-L-aspartové za vzniku *N*-(Fmoc-Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu,

c) odstranění skupiny Fmoc za vzniku *N*-(Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu,

d) kondenzaci *N*-(Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu s $Z-(AA)_n$ za vzniku *N*-$(Z-(AA)_n$-Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu a

e) odstranění chránící skupiny OBu-t za vzniku *N*-$(Z-(AA)_n$-Asp)-*N´*-acetyl-rodaminu.

32. Způsob přípravy sloučeniny podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) reakci rodaminu s anhydridem kyseliny octové za vzniku *N*-acetyl-rodaminu,

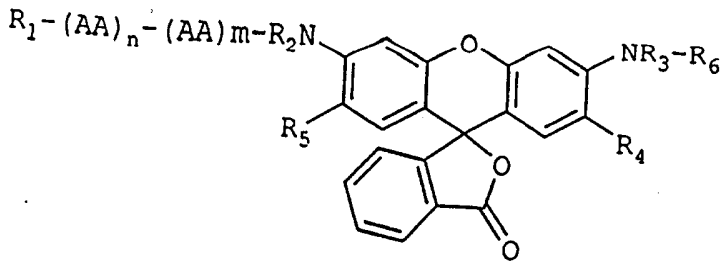
b) kondenzaci *N*-acetyl-rodaminu s $Z-(AA)_n$-Asp(OBu-t) za vzniku N-$(Z-(AA)_n$-Asp(OBu-t))-*N´*-acetyl-rodaminu a

c) odstranění chránící skupiny OBu-t za vzniku *N*-$(Z-(AA)_n$-Asp)-*N´*-acetyl-rodaminu.

33. Způsob podle nároku 31 nebo 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e $-(AA)_n$ je WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, LEV, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP nebo IET.

34. Sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce IX:

12.06.00



IX

nebo její biologicky přijatelná sůl nebo pro-reportní molekula, kde

R_1 je vodík nebo skupina chránící N-konec,

R_6 je chránící skupina, která není aminokyselinou nebo derivátem aminokyseliny,

každé AA nezávisle představuje zbytek α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny nebo derivátu α-aminokyseliny nebo β-aminokyseliny,

n je celé číslo 0 až 5,

m představuje celé číslo od 0 do 3,

R_2 a R_3 představují nezávisle vodík, metyl nebo etyl a

R_4 a R_5 představují nezávisle vodík nebo metyl.

35. Sloučenina podle nároku 34, kde R_2, R_3, R_4 a R_5 je vodík.

36. Sloučenina podle nároku 34, R_1 je H, n=1, $(AA)_n$ je M, m je celé číslo 1 až 2 a $(AA)_m$ je vybráno ze skupiny zahrnující GG, GA, AG, G a A.

37. Sloučenina podle nároku 34, vybraná ze skupiny zahrnující
N-(GP)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110
N-(GPG)-N´-etoxykarbonyl-rodamin 110 a
N-G-N´-oktyloxykarbonyl-rodamin 110.

38. Sloučenina podle nároku 34, kde R_7 představuje chránící skupinu N-konce vybranou ze skupiny zahrnující t-butyloxykarbonyl, acetyl, hexanoyl, oktanoyl, dodekanoyl a benzyloxykarbonyl.

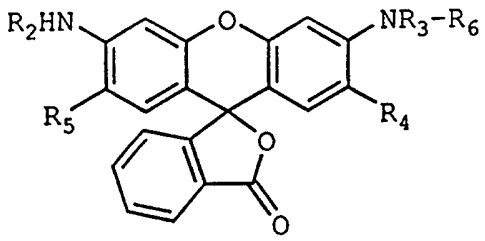
39. Sloučenina podle nároku 34, kde $(AA)_n$-$(AA)_m$ je vybráno ze skupiny zahrnující SQNY-PIV SEQ ID NO: 28, ARVL-AEA SEQ ID NO: 29, ATIM-MQR SEQ ID NO: 30, RQAN-FLG SEQ ID NO: 31, PGNF-LQS SEQ ID NO: 32, SFSF-PQI SEQ ID NO: 33, TLNF-PIS SEQ ID NO: 34, AETF-YVD SEQ ID NO: 35 nebo RKVL-FLD SEQ ID

12.06.00

NO: 36, SQNY-PI SEQ ID NO: 117, ARVL-AE SEQ ID NO: 118, ATIM-MQ SEQ ID NO: 119, RQAN-FL SEQ ID NO: 120, PGNF-LQ SEQ ID NO: 121, SFSF-PQ SEQ ID NO: 122, TLNF-PI SEQ ID NO: 123, AETF-YV SEQ ID NO: 124 nebo RKVL-FL SEQ ID NO: 125, SQNY-P SEQ ID NO: 126, ARVL-A SEQ ID NO: 127, ATIM-M SEQ ID NO: 128, RQAN-F SEQ ID NO: 129, PGNF-L SEQ ID NO: 130, SFSF-P SEQ ID NO: 131, TLNF-P SEQ ID NO: 132, AETF-Y SEQ ID NO: 133 a RKVL-F SEQ ID NO: 134.

40. Sloučenina podle nároku 34, kde $(AA)_n$-$(AA)_m$ je vybráno ze skupiny zarnující LRGGG SEQ ID NO: 101, LRGGA SEQ ID NO: 102, MRGGG SEQ ID NO: 96, MRGGA SEQ ID NO: 135, IRGGG SEQ ID NO: 97, IRGGA SEQ ID NO: 136, LVGGG SEQ ID NO: 98, LVGGA SEQ ID NO: 137, MVGGG SEQ ID NO: 99, MVGGA SEQ ID NO: 138, IVGGG SEQ ID NO: 100, IVGGA SEQ ID NO: 139, LRGG SEQ ID NO: 55, MRGG SEQ ID NO: 56, IRGG SEQ ID NO: 57, LVGG SEQ ID NO: 58, MVGG SEQ ID NO: 59 a IVGG SEQ ID NO: 60.

41. Sloučenina obecného vzorce VI:



VI

nebo její biologicky přijatelná sůl, kde

R_2 a R_3 představují nezávisle vodík, metyl nebo etyl a

R_4 a R_5 představují nezávisle vodík nebo metyl,

R_6 je chránící skupina, která není aminokyselinou nebo derivátem aminokyseliny.

42. Sloučenina podle nároku 41, kde R_2, R_3, R_4 a R_5 představují vodík.

43. Sloučenina podle nároku 41, kde R_2 a R_3 je metyl a R_4 a R_5 představují vodík.

44. Sloučenina podle nároku 41, kde R_2 a R_3 je etyl a R_4 a R_5 představují metyl.

45. Sloučenina podle nároku 41, vybraná ze skupiny zahrnující
N-metoxykarbonyl-rodamin 110
N-etoxykarbonyl-rodamin 110
N-hexyloxykarbonyl-rodamin 110
N-oktyloxykarbonyl-rodamin 110
N-decyloxykarbonyl-rodamin 110 a
N-dodecyloxykarbonyl-rodamin 110.

46. Sloučenina podle nároku 41, vybraná ze skupiny zahrnující
N-dimetylkarbamyl-rodamin 110,
N-(N-metyl-N-hexylkarbamyl)-rodamin 110
N-metansulfonyl-rodamin 110,
N-(etylthio)karbonyl-rodamin 110,
N-(hexylthio)karbonyl-rodamin 110,
N-(oktylthio)karbonyl-rodamin 110,
N-acetyl-rodamin 110,
N-acetyl-rodamin 116,
N-(2, 5, 8-trioxadecyloxykarbonyl)-rodamin 110 a
N-(2-butoxyetoxykarbonyl)-rodamin 110.

47. Způsob detekce enzymu účastnícího se v apoptózové kaskádě v jedné nebo více buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje

a) kontakt uvedené jedné nebo více buněk s reportní sloučeninou podle nároku 1 nebo 14 za podmínek, kdy uvedená reportní sloučenina je pohlcena jednou nebo více uvednými buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedené jedné nebo více buněk, kde změna fluorescence v uvedené jedné nebo více buňkách v porovnání s kontrolními buňkami, které se nedostaly do takového kontaktu, je indikací přítomnosti enzymu.

48. Způsob podle nároku 47, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený enzym je vnitrobuněčná kaspáza.

12.06.00

49. Způsob měření aktivity enzymu, který se účastní apoptózové kaskády v jedné nebo více buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje

a) kontakt uvedené jedné nebo více buněk s reportní sloučeninou podle nároku 1 nebo 14 za podmínek, kdy uvedená reportní sloučenina je pohlcena uvedenou jednou nebo více buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedené jedné nebo více buněk, kde relativní změna fluorescence v uvedené jedné nebo více buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami, které nepřišly do takového kontaktu, je míra aktivity enzymu.

50. Způsob podle nároku 49, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený enzym je vnitrobuněčná kaspáza.

51. Způsob stanovení, zda testovaná sloučenina má účinek na enzym, který se účastní apoptózové kaskády v jedné nebo více testovaných buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) kontakt uvedené jedné nebo více testovaných buněk s uvedenou testovanou látkou a reportní sloučeninou podle nároku 1 nebo 14 za podmínek, kdy uvedená testovaná látka buď interaguje s externím receptorem nebo je pohlcena uvedenou jednou nebo více buňkami a uvedená reportní sloučenina je pohlcena uvedenou jednou nebo více buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedené jedné nebo více testovaných buněk, ve srovnání s kontrolními buňkami, které nepřišly do kontaktu s uvedenou reportní sloučeninou, kde změna fluorescence v uvedené jedné nebo více buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami ukazuje, že uvedená testovaná látka vykazuje účinek na uvedený enzym.

52. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený enzym je vnitrobuněčná kaspáza.

53. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jedna nebo více testovaných buněk se uvádí do

kontaktu s uvedenou testovanou látkou dříve než se kontaktují s uvedenou reportní sloučeninou.

54. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jedna nebo více testovaných buněk se uvádí do kontaktu s uvedenou testovanou látkou po kontaktu s uvedenou reportní sloučeninou.

55. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jedna nebo více testovaných buněk se uvádí do kontaktu v podstatě současně s uvedenou testovanou látkou a s uvedenou reportní sloučeninou.

56. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e spočívá ve stanovení, zda uvedená testovaná látka stimuluje aktivitu uvedeného enzymu.

57. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e stanovuje, zda uvedená testovaná látka inhibuje aktivitu uvedeného enzymu.

58. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e krok kontaktu dále zahrnuje kontakt uvedené jedné nebo více testovaných buněk alespoň s jednou sekundární testovanou látkou v přítomnosti uvedené první testované látky.

59. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená jedna nebo více testovaných buněk je získána z jednobuněčného organizmu.

60. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená jedna nebo více testovaných buněk je získána z mnohobuněčného organizmu.

61. Způsob podle nároku 60, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený mnohobuněčný organizmus je vybrán ze skupiny zahrnující savce, bezobratlého živočicha, hmyz a rostlinu.

62. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jedna nebo více testovaných a kontrolních buněk je získáno ze skupiny zahrnující vlasy, srst, mozek,

periferní nervový systém, oči, uši, nos, ústa, mandle, zuby, jícen, plíce, prsy, srdce, krev, krevní cévy, kostní dřeň, lymfatické uzliny, brzlík, slezinu, imunitní systém, játra, žaludek, střevní trakt, pankreas, žlázy a tkáně s vnitřní sekrecí, ledviny, močový měchýř, reprodukční orgány nebo žlázy, klouby, kosti a kůži uvedeného mnohobuněčného organizmu.

63. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jedna nebo více testovaných buněk jsou buňky zhoubného bujení.

64. Způsob podle nároku 63, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená jedna nebo více testovaných buněk zhoubného bujení je získáno ze skupiny zahrnující mozek, periferní nervový systém, oči, uši, nos, ústa, mandle, zuby, jícen, plíce, prsy, srdce, krev, krevní cévy, kostní dřeň, lymfatické uzliny, brzlík, slezinu, imunitní systém, játra, žaludek, střevní trakt, pankreas, žlázy a tkáně s vnitřní sekrecí, ledviny, močový měchýř, reprodukční orgány nebo žlázy, klouby, kosti a kůži uvedeného mnohobuněčného organizmu.

65. Způsob podle nároku 63, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená jedna nebo více testovaných buněk zhoubného bujení je získáno od člověka potřebujícího léčbu chemoterapeutickem a uvedená testovaná látka je chemoterapeutické činidlo.

66. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e testovaná látka je chemoterapeutické činidlo.

67. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e testovaná látka je směs chemoterapeutických činidel.

68. Způsob stanovení citlivosti živočicha se zhoubným bujením k léčbě jedním nebo více chemoterapeutickými činidly, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

12.06.00

a) kontakt buněk zhoubného bujení získaných z uvedeného živočicha s uvedeným jedním nebo více chemoterapeutickými činidly a reportní sloučeninou podle nároku 1 nebo 14 za podmínek, kdy uvedené jedno nebo více činidel buď interaguje s externím receptorem nebo je pohlceno uvedenými buňkami zhoubného bujení a

b) zaznamenávání fluorescence uvedených buněk zhoubného bujení ve srovnání s kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu pouze s uvedenou reportní sloučeninou, kde změna fluorescence v uvedených buňkách zhoubného bujení ve srovnání s kontrolními buňkami ukazuje, že uvedené buňky zhoubného bujení jsou chemosenzitivní vůči jednomu nebo více chemoterapeutických činidel a že uvedený živočich je citlivý vůči uvedené léčbě.

69. Způsob podle nároku 68, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedeným živočichem je člověk.

70. Způsob sledování léčby živočicha, které se léčí jedním nebo více chemoterapeutickými činidly, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) aplikaci uvedeného jednoho nebo více chemoterapeutických činidel uvedenému živočichu,

b) kontakt buněk získaných ze živočicha po uvedené aplikaci reportní sloučeniny podle nároku 1 nebo 14 za podmínek, kdy uvedená reportní sloučenina je pohlcena uvedenými buňkami a

c) zaznamenávání fluorescence uvedených buněk, které přišly do kontaktu s reportní sloučeninou, ve srovnání s kontrolními buňkami, které se odebraly uvedenému živočichu před uvedenou aplikací, kde změna fluorescence v uvedených buňkách odebraných uvedenému živočichu ve srovnání s uvedenými kontrolními buňkami ukazuje, že uvedený živočich je citlivý vůči chemoterapeutickým činidlům.

71. Způsob podle nároku 70, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený živočich trpí onemocněním, které souvisí s apoptickým odumírání buněk.

12.06.00

72. Způsob stanovení, zda testovaná látka inhibuje nebo zamezuje odumírání buněk v jedné nebo více testovaných buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) kontakt jedné nebo více testovaných buněk s uvedenou testovanou látkou a reportní sloučeninou podle nároku 1 nebo 14 za podmínek, kdy uvedená reportní sloučenina je pohlcena uvedenou jednou nebo více buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedené jedné nebo více testovaných buněk ve srovnání s kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu pouze s uvedenou reportní sloučeninou, kde pokles fluorescence v uvedené jedné nebo více testovaných buňkách ve srovnání s uvedenými kontrolními buňkami indikuje, že uvedená testovaná látka inhibuje nebo zamezuje odumírání buněk.

73. Způsob podle nároku 72, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená jedna nebo více testovaných buněk jsou nervové buňky.

74. Způsob podle nároku 72, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená jedna nebo více testovaných buněk je vybrána ze skupiny zahrnující buňky srdečního svalu, imunitní buňky, buňky orgánu, který bude transplantován, spermatozoa, vajíčko, buněčné linie, které produkují rekombinantní protein, vlasové buňky, buňky kůže a nervové buňky.

75. Způsob stanovení, zda testovaná látka způsobuje nebo zesiluje odumírání buněk u jedné nebo více testovaných buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) kontakt uvedené jedné nebo více testovaných buněk s uvedenou testovanou látkou a reportní sloučeninou podle nároku 1 nebo 14 za podmínek, kdy uvedená reportní sloučenina je pohlcena uvedenou jednou nebo více buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedené jedné nebo více testovaných buněk ve srovnání s kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu pouze s uvedenou reportní sloučeninou,

přičemž zvýšení fluorescence v uvedené jedné nebo více testovaných buňkách ve srovnání s uvedenými kontrolními buňkami ukazuje, že uvedená testovaná látka způsobuje nebo zesiluje odumírání buněk.

76. Způsob podle nároku 75, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená jedna nebo více testovaných buněk jsou buňky zhoubného bujení, kvasinky, houby nebo bakterie.

77. Způsob detekce virové proteázy v jedné nebo více buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) kontakt uvedených buněk s reportní sloučeninou podle nároku 34 za podmínek, kdy reportní sloučenina je pohlcena buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedených buněk, kde změna fluorescence v buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami, které nebyly takto kontaktovány, indikuje přítomnost virové proteázy.

78. Způsob měření aktivity virové proteázy v jedné nebo více virem infikovaných buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje

a) kontakt uvedené jedné nebo více virem infikovaných buněk s reportní sloučeninou podle nároku 34 za podmínek, kdy reportní sloučenina je pohlcena uvedenou jednou nebo více virem infikovanými buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedené jedné nebo více buněk, kde změna fluorescence uvedené jedné nebo více virem infikovaných buněk ve srovnání s kontrolními buňkami, které nebyly takto kontaktovány, je mírou aktivity virové proteázy.

79. Způsob stanovení zda testovaná látka vykazuje účinek na aktivitu virové proteázy v jedné nebo více virem infikovaných buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) kontakt uvedených virem infikovaných testovaných buněk s uvedenou testovanou látkou a reportní sloučeninou podle

12.06.00

nároku 34 za podmínek, kdy uvedená reportní sloučenina je pohlcena uvedenými infikovanými testovanými buňkami a

b) zaznamenávání fluorescence uvedených infikovaných testovaných buněk ve srovnání s infikovanými kontrolními buňkami, které přišly do kontaktu pouze s uvedenou reportní sloučeninou, přičemž změna fluorescence v uvedených infikovaných testovaných buňkách ve srovnání s uvedenými infikovanými kontrolními buňkami je indikace, že uvedená testovaná látka vykazuje účinek na virovou proteázu.

80. Způsob podle libovolného z nároků 77 až 79, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené buňky jsou buňky infikované HIV a virová proteáza je proteáza HIV.

81. Způsob podle libovolného z nároků 77 až 79, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené buňky jsou buňky infikované adenovirem a virová proteáza je proteáza adenoviru.

82. Způsob podle libovolného z nároků 77 až 79, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené buňky jsou buňky infikované HSV a virová proteáza je proteáza HSV.

83. Způsob podle libovolného z nároků 77 až 79, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené buňky jsou buňky infikované HCMV a virová proteáza je proteáza HCMV.

84. Způsob podle libovolného z nároků 77 až 79, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené buňky jsou buňky infikované HCV a virová proteáza je proteáza HCV.

85. Způsob měření aktivity proteázy nebo peptidázy v buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) kontakt testovaných buněk s reportní sloučeninou podle nároku 34 za podmínek, kdy reportní sloučenina je pohlcena uvedenými testovanými buňkami nebo reportní sloučenina interaguje s proteázou nebo peptidázou vnější membrány uvedených buněk a

b) zaznamenávání fluorescence uvedených buněk, přičemž změna fluorescence v uvedené testované buňce ve srovnání

12.06.00

s kontrolními buňkami, které se nedostaly do takového kontaktu, je mírou aktivity uvedené proteázy nebo peptidázy.

86. Způsob stanovení, zda testovaná látka vykazuje účinek na aktivitu proteázy nebo peptidázy v testovaných buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) kontakt uvedených testovaných buněk s uvedenou testovanou látkou a reportní sloučeninou podle nároku 34 za podmínek, kdy uvedená reportní sloučenina je pohlcena uvedenými testovanými buňkami nebo reportní sloučenina interaguje s proteázou nebo peptidázou vnější membrány uvedených buněk a

c) zaznamenávání fluorescence uvedených testovaných buněk ve srovnání s kontrolními buňkami, které se dostaly do kontaktu pouze s uvedenou reportní sloučeninou, přičemž změna fluorescence v testovaných buňkách ve srovnání s uvedenými kontrolními buňkami indikuje, že uvedená testovaná látka vykazuje účinek na uvedenou proteázu nebo peptidázu.

87. Způsob podle libovolného z nároků 85 až 86, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené buňky jsou endoteliální buňky a peptidáza je aminopeptidáza methioninu typ 2.

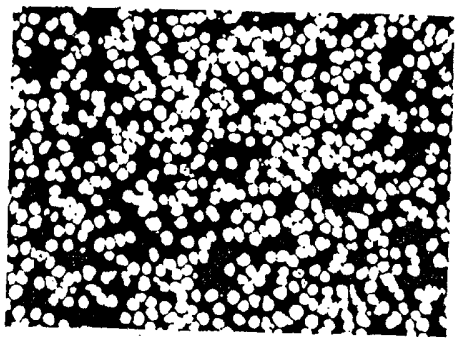
88. Způsob podle libovolného z nároků 85 až 86, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené buňky jsou T buňky a peptidáza je dipeptidylpeptidáza-IV.

89. Způsob podle libovolného z nároků 85 až 86, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené buňky jsou neuronové buňky a proteáza je kalpain.

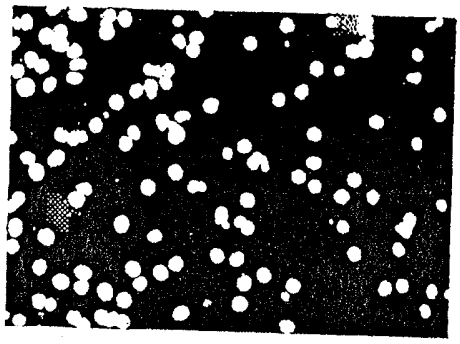
90. Způsob podle libovolného z nároků 85 až 86, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená peptidáza je aminopeptidáza.

12.06.00

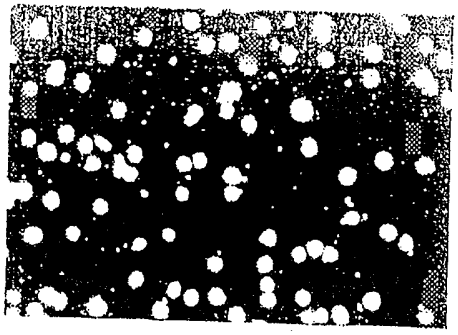
PV 2000-1158



Obrázek č. 1A



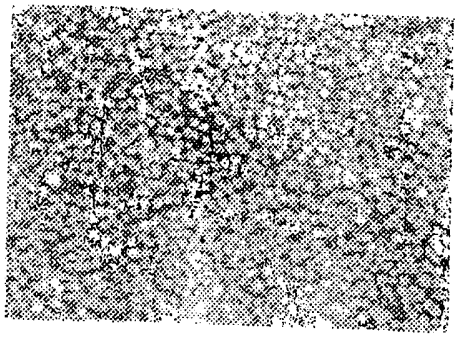
Obrázek č. 1B



Obrázek č. 1C



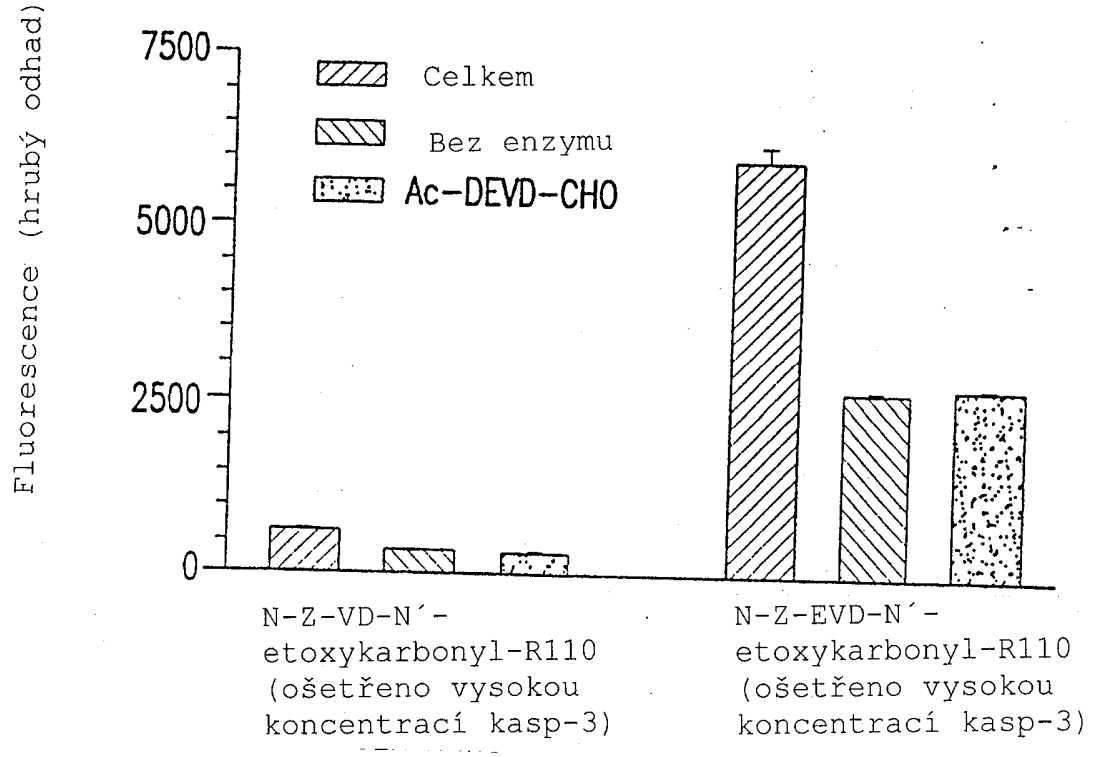
Obrázek č. 1D



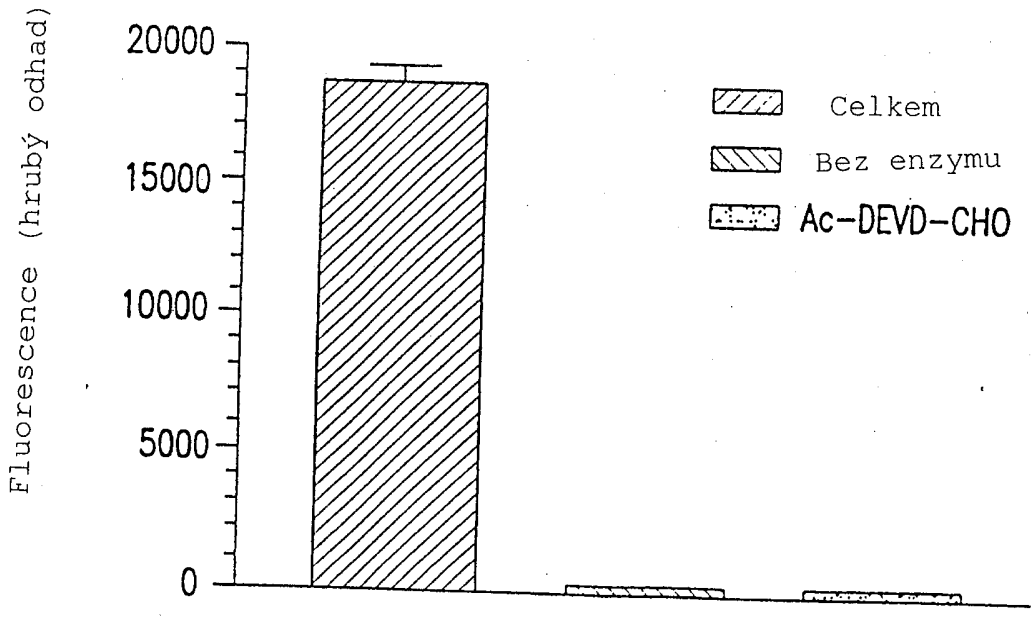
Obrázek č. 1E



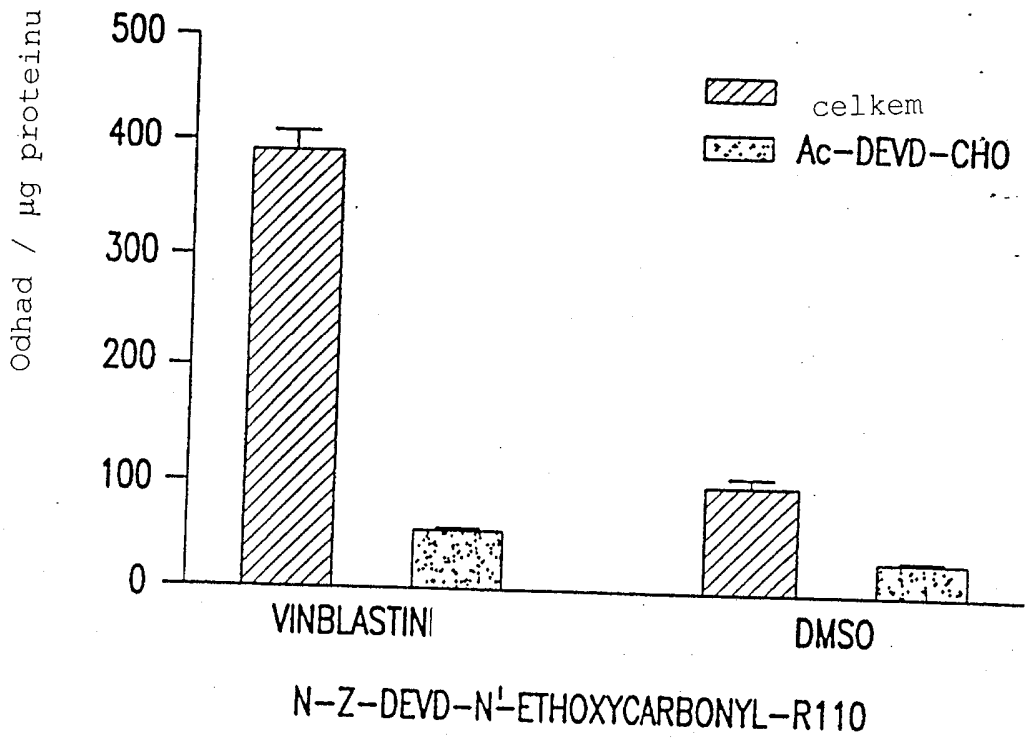
Obrázek č. 1F



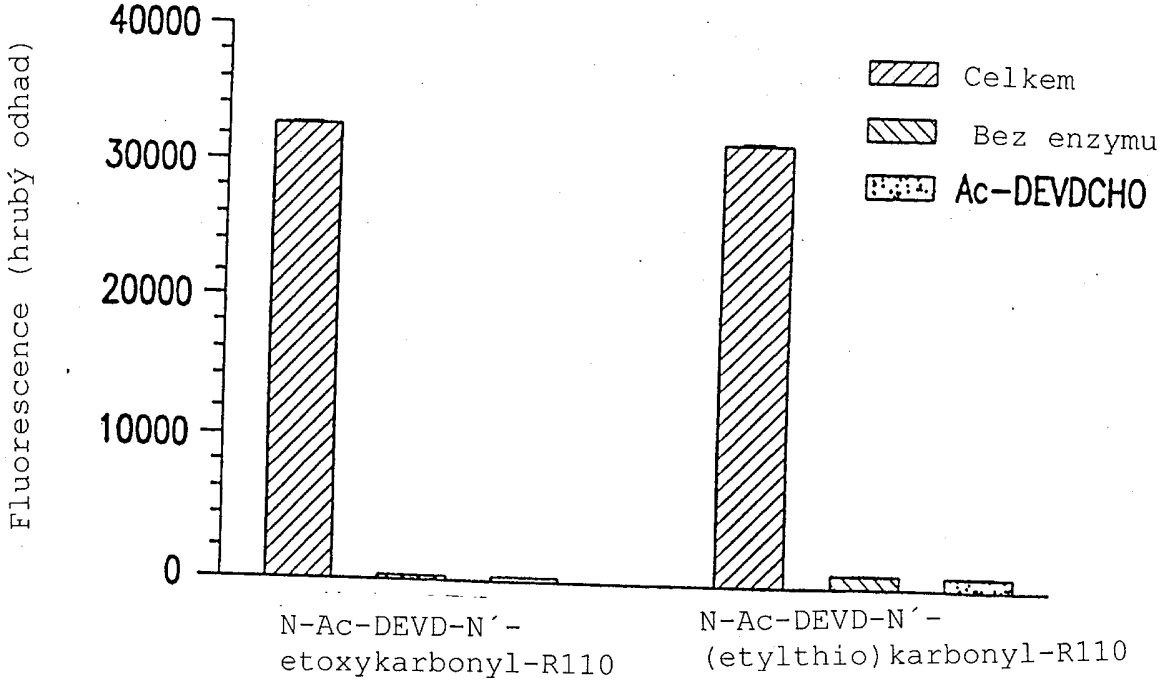
Obrázek č. 2A



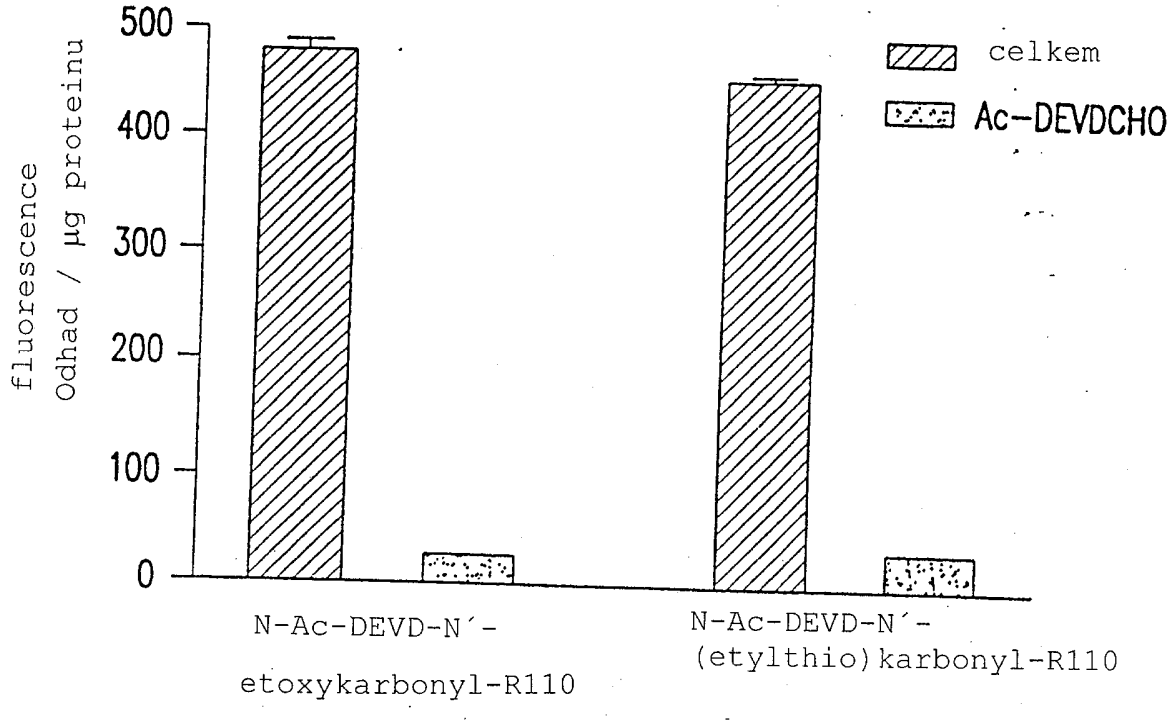
Obrázek č. 2B



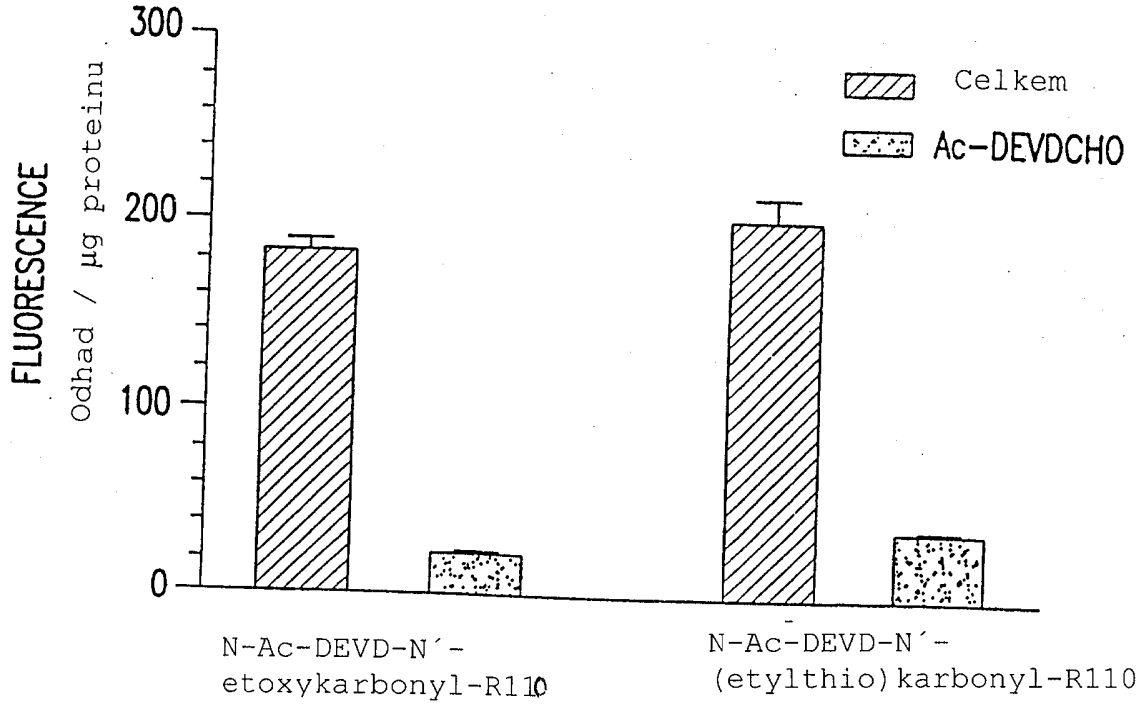
Obrázek č. 2C



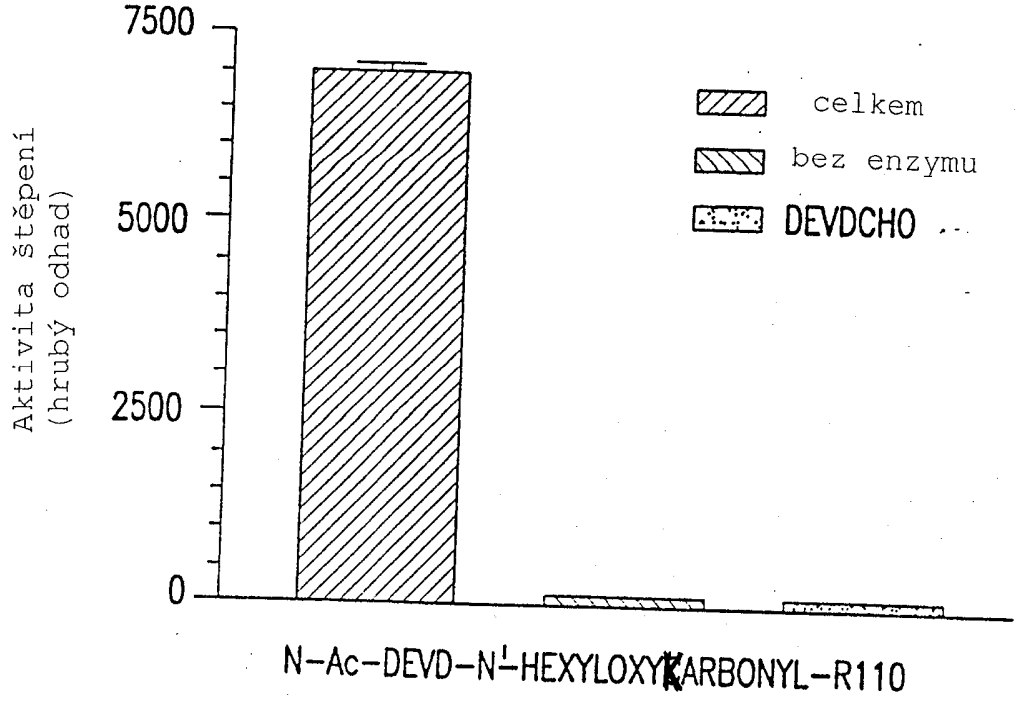
Obrázek č. 2D



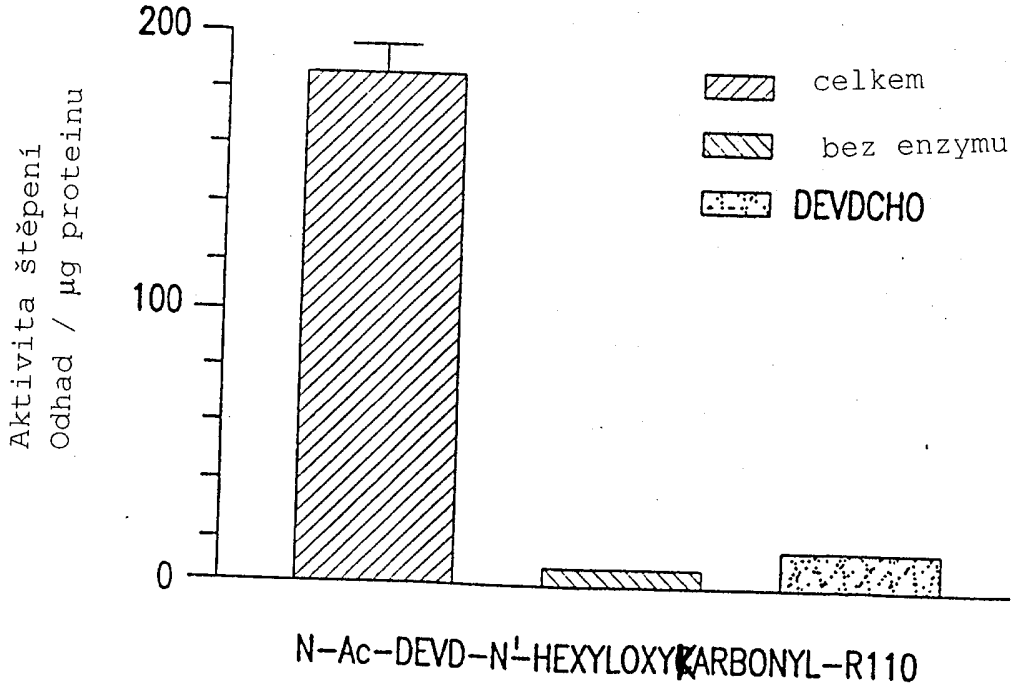
Obrázek č. 2E



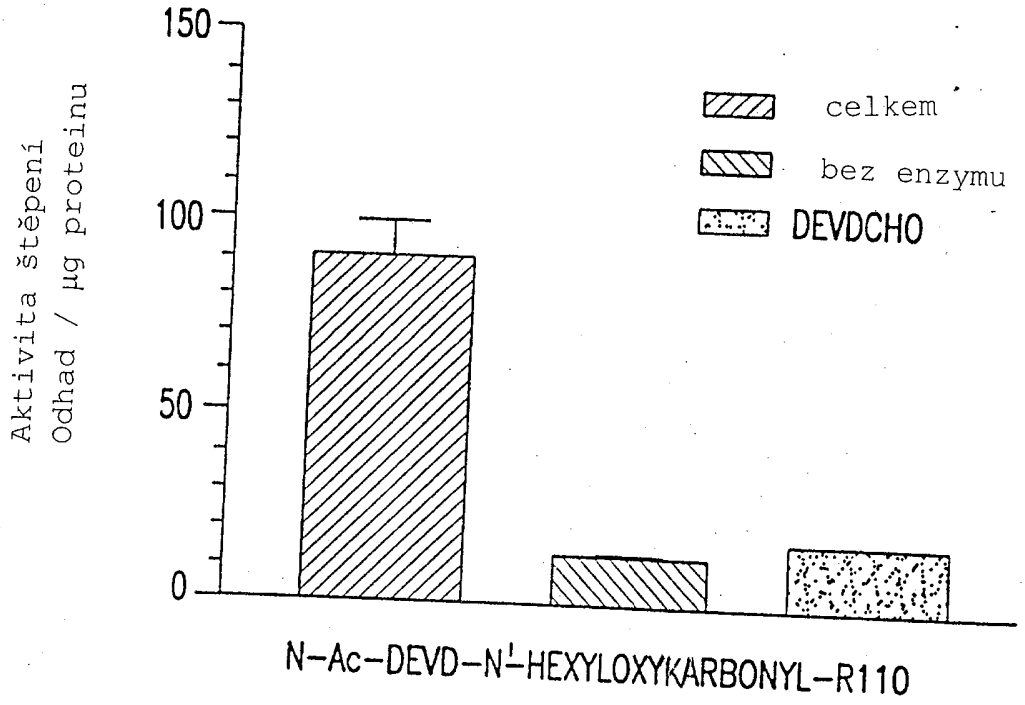
Obrázek č. 2F



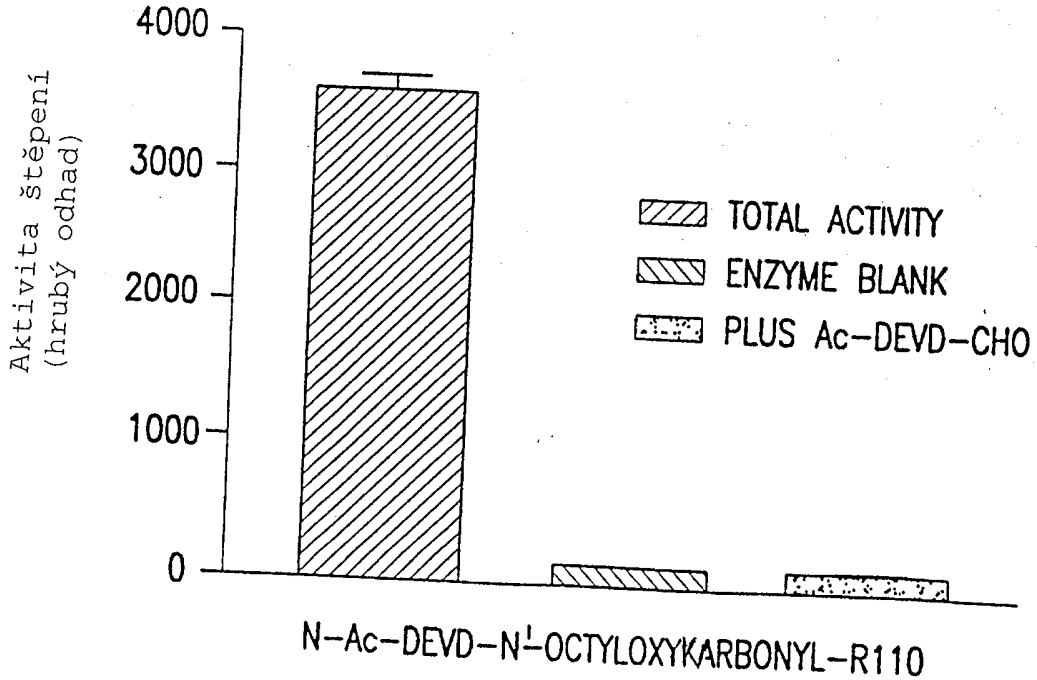
Obrázek č. 2G



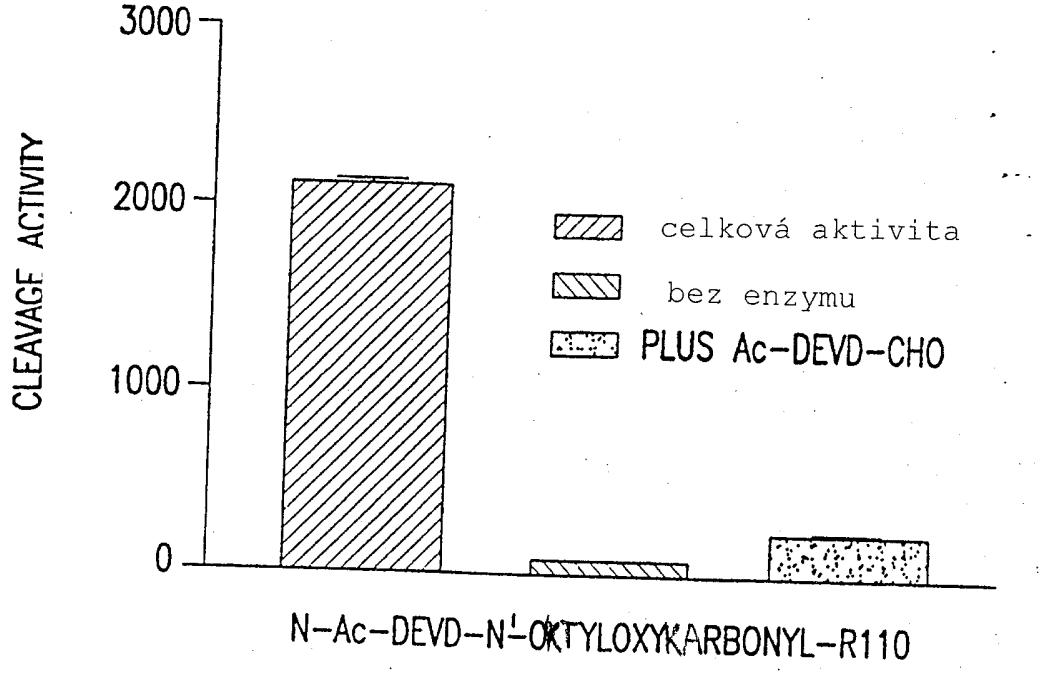
Obrázek č. 2H



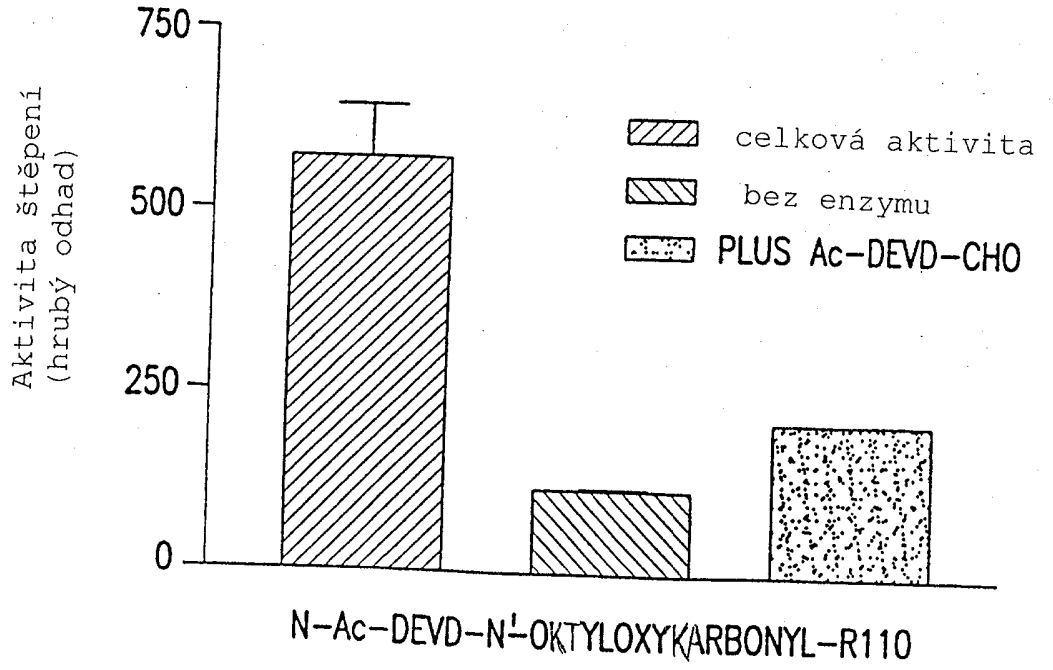
Obrázek č 2I



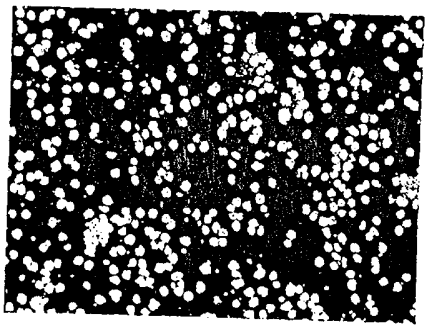
Obrázek č 2J



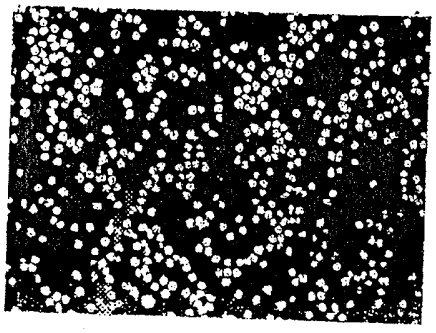
Obrázek č 2K



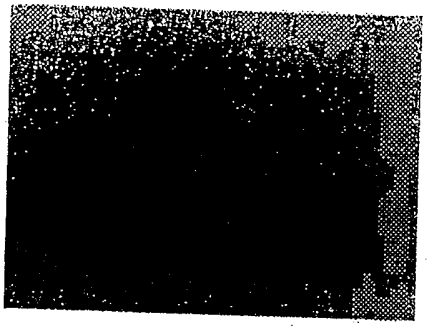
Obrázek č 2L



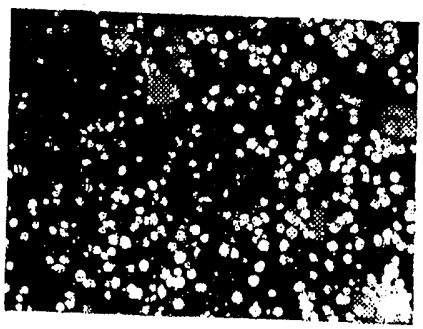
Obrázek č. 3A



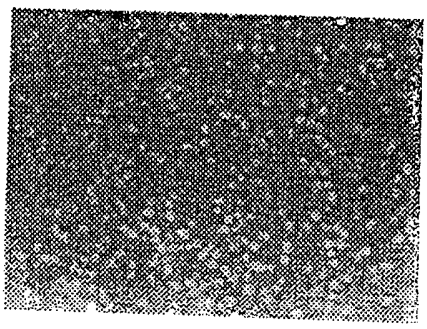
Obrázek č. 3B



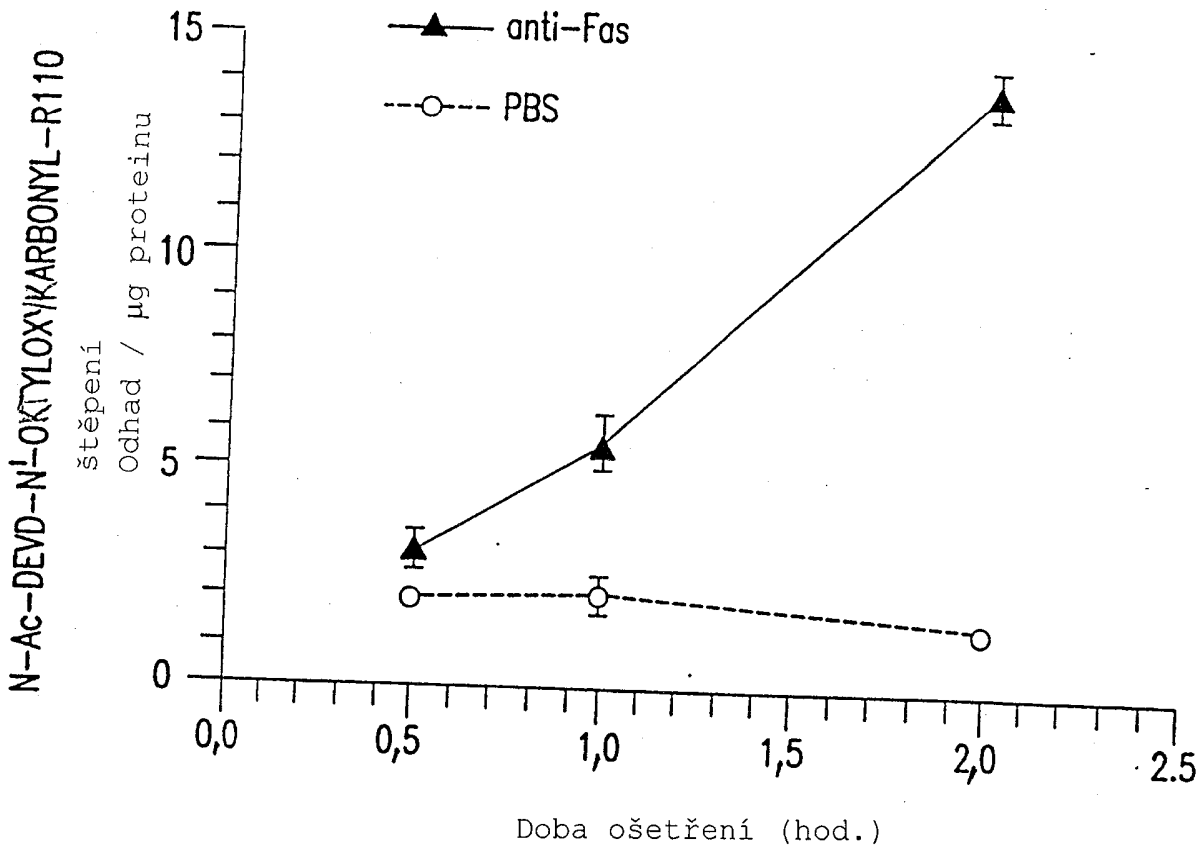
Obrázek č. 3C



Obrázek č. 3D

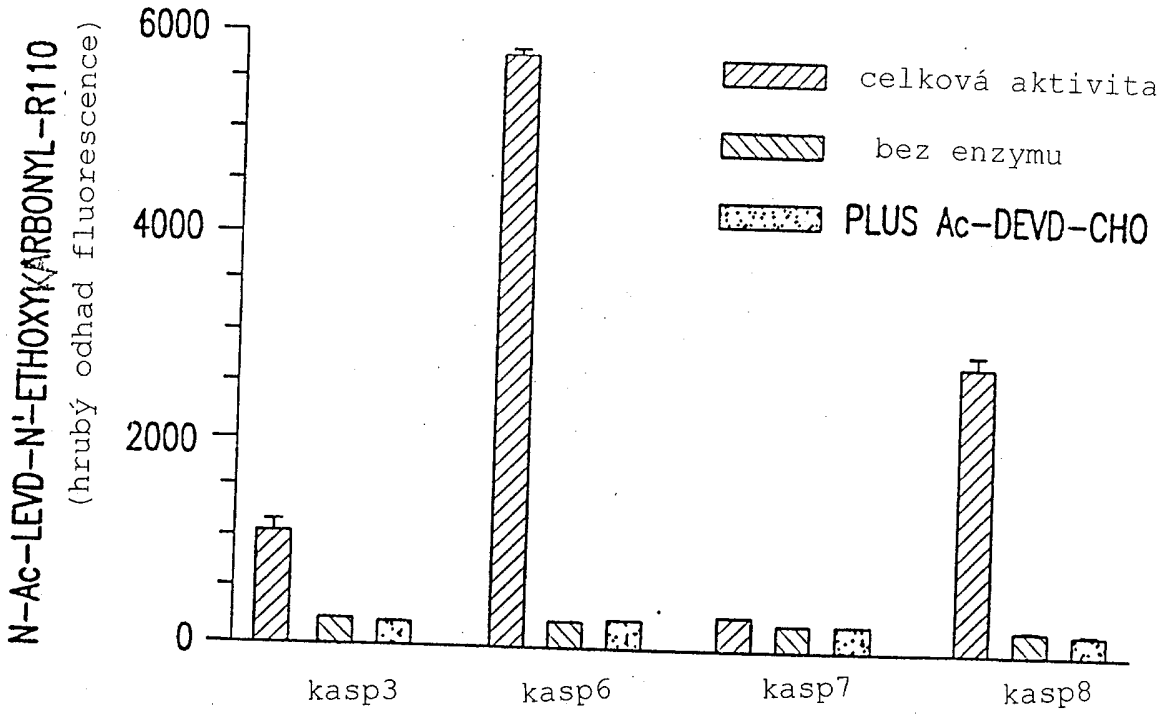


Obrázek č. 3E

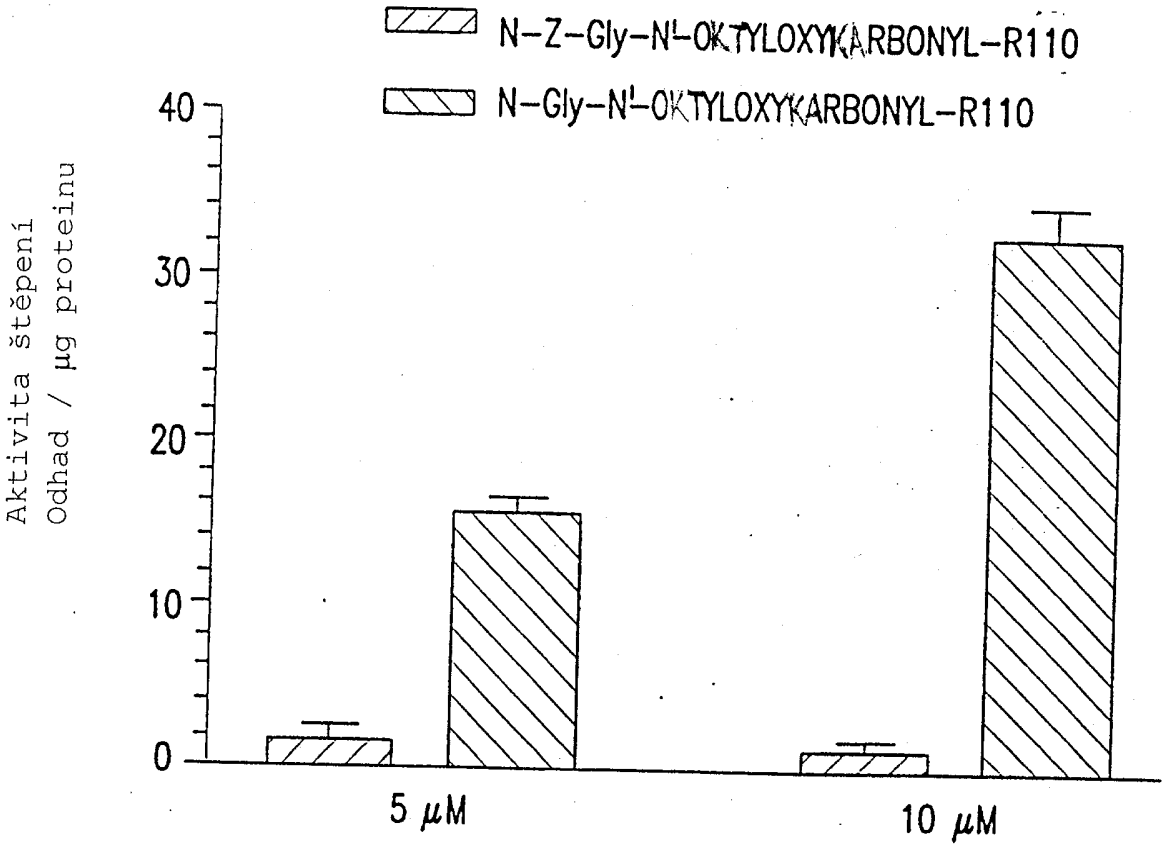

N-Ac-DEVD-N¹-OKTYLOXYKARBONYL-R110
štěpení
Odhad / µg proteinu
anti-Fas
PBS
15
10
5
0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2.5
Doba ošetření (hod.)

Obrázek č. 4

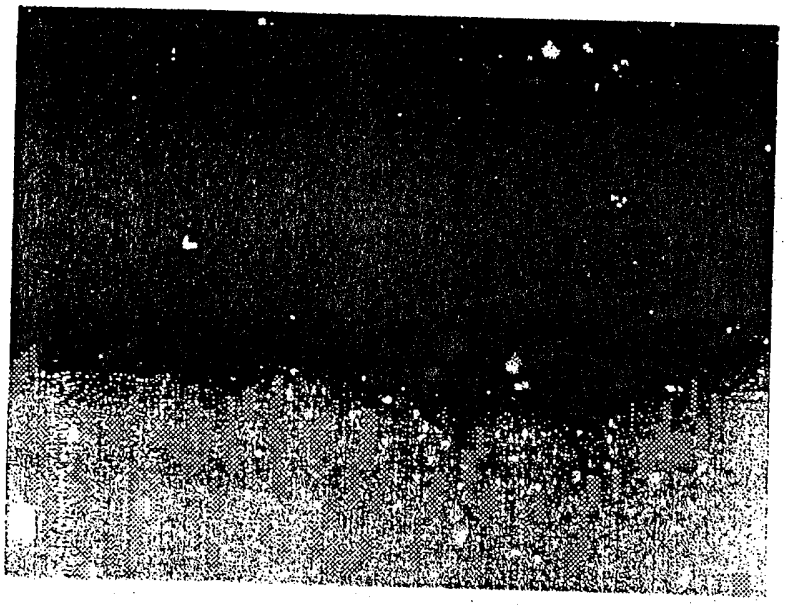
12.06.00
10/12
PV 2000-1158



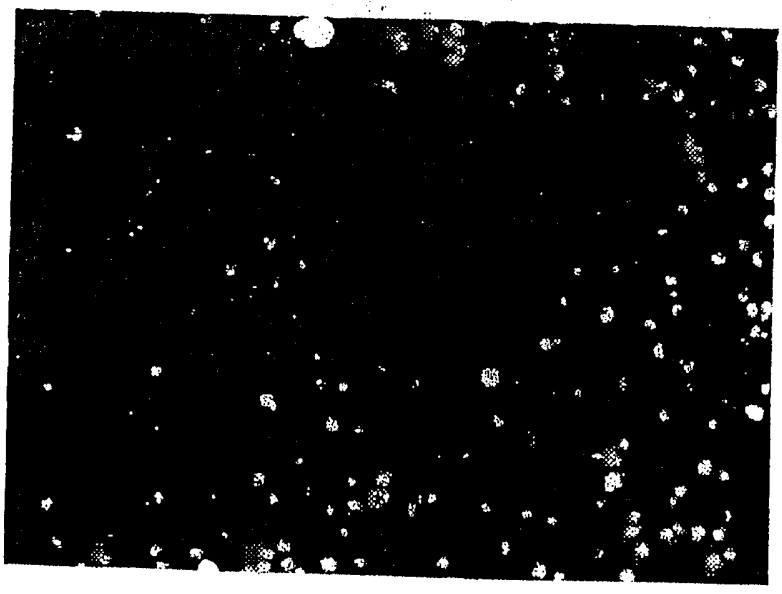
Obrázek č. 5


N-Z-Gly-N'-OKTYLOXYKARBONYL-R110
N-Gly-N'-OKTYLOXYKARBONYL-R110
Aktivita štěpení
Odhad / µg proteinu
40
30
20
10
0
5 µM
10 µM

Obrázek č. 6



Obrázek č. 7A



Obrázek č. 7B