

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2020-154

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 219/10 (2006.01)
C07D 219/12 (2006.01)
C07D 219/06 (2006.01)
C07D 219/04 (2006.01)
C07C 211/61 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.03.2020**

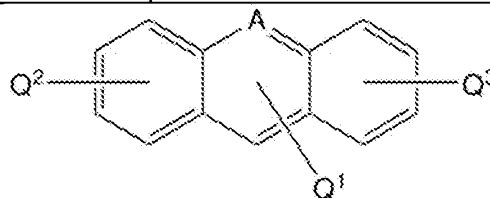
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **29.09.2021**

(Věstník č. 39/2021)

(71) Přihlašovatel:
Univerzita Karlova, Praha 1, Staré Město, CZ
GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, Třebeš,
CZ

(72) Původce:
Mgr. Filip Kostelanský, Považská Bystrica, SK
doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D., Hradec
Králové, Slezské Předměstí, CZ
prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D., Hradec
Králové, Nový Hradec Králové, CZ
doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D., Vysoká
nad Labem, CZ
Ing. Zuzana Havlinová, Ph.D., Pardubice,
Studánka, CZ
PharmDr. Antonín Libra, Ph.D., Vysoká nad
Labem, CZ
Mgr. Pavel Flídr, Lubná, CZ

(74) Zástupce:
MACHU IP | patentová kancelář, Mgr. Matěj
Machů, Ph.D., Václavské náměstí 804/58, 110 00
Praha 1, Nové Město



(54) Název přihlášky vynálezu:

**Deriváty akridinu a antracenu jako
sloučeniny interkalující se do DNA a jejich
použití**

(57) Anotace:

Deriváty akridinu a antracenu nesoucí substituent obsahující uhlíkatý řetězec zakončený azidoskupinou sloužící k azido-alkynové cykloadici, dále výhodně substituované karboxamidovou skupinou k upevnění vazby na dvoušroubovici DNA pomocí vodíkové vazby amidického vodíku přes molekulu vody na fosfátovou skupinu mezi příslušným guanosinem a sousedním nukleosidem. Použití derivátů akridinu a antracenu výhodně zakončených azidoskupinou ke zvýšení pevnosti vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se interakce a k ovlivnění teploty tání vznikajícího duplexu.

Deriváty akridinu a antracenu jako sloučeniny interkalující se do DNA a jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález náleží do oblasti organické chemie, biochemie a molekulární genetiky. Týká se látek schopných interkalovat se do dvoušroubovice DNA, a zvýšit tak její teplotu tání.

Dosavadní stav techniky

Za účelem stabilizace duplexu dvoušroubovice DNA je v současné době zkoumáno nebo již existuje několik typů chemických modifikací nukleových kyselin.

Patří sem tzv. Locked nucleic acids (LNA, O2'-C4'-methylenenovou skupinou přemostěný cyklus ribosy), resp. Bridged Nucleic Acids (BNA, O2'-C4'-methylenaminoskupinou přemostěný cyklus ribosy).

O dosažení vyšší stability duplexu DNA usilují i další technologie, např. využití organických polyaminů (NOIR R., KOTERA M., PONS B., REMY J.S., BEHR J.P. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, vol. 130, p. 13500-13505; US 8465921).

Velký potenciál má pak využití molekul vázajících se do malého žlábků DNA (MGB, Minor Groove Binders) nebo působících jako interkalátory. Je známo, že molekuly některých sloučenin jsou schopné vsunout se a vázat do malého žlábků dvoušroubovice DNA (minor groove) nebo mezi báze dvoušroubovice DNA (interkalovat se), a v důsledku toho zvyšovat pevnost vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se interakce, a tím teplotu tání vznikajícího duplexu.

Řada molekul působících mechanismem vazby do malého žlábků dvoušroubovice DNA je zkoumána, testována a v některých případech i klinicky využívána pro svou schopnost do určité míry sekvenčně specificky blokovat realizaci genetické informace jako terapeutika, především bakteriálních a parazitárních infekcí, ale i jako potenciální antivirotika či antineoplastika (WARTELL R.M., LARSON J.E., WELLS R.D. *J. Biol. Chem.* 1974, vol. 249, p. 6719-6731; ZIMMER C. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1975, vol. 15, p. 285-318; NGUYEN B., NEIDLE S., WILSON W.D. *Acc. Chem. Res.* 2009, vol. 42, p. 11-21; ARAFA R.K., ISMAIL M.A., MUNDE M., WILSON W.D., WENZLER T., BRUN R., BOYKIN D.W. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, vol. 43, p. 2901-2908; FU X.B., LIU D.D., LIN Y., et al. *Dalton Trans.*, 2014, vol. 43, p. 8721-8737; WANG M., YU Y., LIANG CH., et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, vol. 17, p. 779-795; ALNISS H.Y. *J. Med. Chem.* 2019, vol. 62, p. 385-402; aj.). Díky vazbě v malém žlábků komplikují transkripci a následně tedy translaci a množení nežádoucích buněk či tkání. Z klinicky významných je možno uvést např. pentamidin.

Velkou oblastí využití MGB i interkalátorů je molekulární biologie a diagnostika. Z MGB patří mezi nejvýznamnější molekuly pro tyto aplikace sloučeniny typu Hoechst (PJURA P.E., GRZESKOWIAK K., DICKERSON R.E. *J. Mol. Biol.* 1987, vol. 197, p. 257-271). Komerčně v oblasti molekulární biologie jako MGB využívá molekuly nezveřejněné struktury např. společnost Applied Biosystems Inc. (nyní Life Technologies Corp.). Jako komponentu pro syntézu oligonukleotidů dodává společnost Glen Research MGB charakteru trimeru pyrroloindolu CDPI₃ (trimer-amid 1,2-dihydro-(3H)-pyrrolo[3,2-e]indol-7-karboxylové kyseliny). Základní struktura této molekuly, odvozená ze struktury duokarmycinů, je známa již řadu let, její syntéza je poměrně komplikovaná a problematická může být i stabilita (BOGER D.L., COLEMAN R.S., INVERGO B.J. *J. Org. Chem.* 1987, vol. 52, no. 8, p. 1521-1530). Ani CDPI₃ však není vhodný pro všechny aplikace (US 5801155, US 6084102, US 7582739, US 20110172289) a je zakázáno používat uvedenou komponentu pro komerční výrobu oligonukleotidů bez další licenční dohody.

Strukturně jsou látky působící mechanismem MGB poměrně různorodé, např. heterocyklické oligoamidy netropsin, distamycin a jejich analogy, diamidino- resp. diguanidinosubstituované látky jako pentamidin, berenil, 4',6-diamidino-2-fenylindol (LARSEN T.A., GOODSELL D.S., CASCIO D., GRZESKOWIAK K., DICKERSON R.E. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1989, vol. 7, p. 477-491) i méně bazické deriváty benzimidazolu (Hoechst sloučeniny), případně kombinace uvedených struktur (SHENG J., GAN J., HUANG Z. *Med. Res. Rev.* 2013, vol. 33, no. 5, p. 1119-1173). Předpokladem vazby do malého žlábků DNA je vhodné prostorové zakřivení molekuly, schopnost vytvářet van der Waalsovy a vodíkové vazby s exocyklickými skupinami a heterocyklickými dusíky nukleovýchází a výhodou je vzhledem k anionickému charakteru nativních řetězců DNA bazicita MGB molekul (KIELKOPF C.L., WHITE S., SZEWCZYK J.W., TURNER J.M., BAIRD E.E., DERVAN P.B., REES D.C. *Science* 1998, vol. 282, p. 111-115; SQUIRE C.J., BAKER L.J., CLARK G.R., MARTIN R.F., WHITE J. *Nucleic Acids Res.* 2000, vol. 28, p. 1252-1258; NEIDLE S., MANN J., RAYNER E., BARON A., BOAHEN Y., SIMPSON I.J., SMITH N.J., FOX K.R., HARTLEY J.A., KELLAND L.R. *Chem. Commun.* 1999, p. 929-930). Jednotlivé typy vazeb se uplatňují u molekul MGB v různé míře; van der Waalsovy vazby jsou základem interakce látek typu Hoechst s DNA, naproti tomu vodíkové vazby jsou klíčové u oligoamidů (netropsin, distamycin). Mezi MGB patří jak molekuly s poměrně flexibilní strukturou, jejichž příkladem je pentamidin, tak i poměrně rigidní, např. již zmíněné deriváty benzimidazolu. Několik typů látek působících mechanismem MGB je patentováno za účelem využití pro stabilizaci duplexů nukleových kyselin, např. distamycin a jeho deriváty (US 5955590, US 6949367). Publikovány byly i duplex stabilizující konjugáty oligonukleotidů s analogy barviva Hoechst 33258 (RAJUR S.B., ROBLES J., WIEDERHOLT K., KUIMELIS R.G., MCLAUGHLIN L.W. *J. Org. Chem.* 1997, vol. 62, p. 523-529) nebo DAPI.

Podobně je i řada molekul působících jako interkalátory zkoumána, testována, a to mnohem častěji než MGB, pro svou schopnost blokovat realizaci genetické informace jako terapeutika bakteriálních a parazitárních infekcí, jako potenciální antivirotika, klinicky jsou však interkalátory využívány především jako antineoplastika (např. GOFTAR M.K., KOR N.M., KOR Z.M. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 2014, vol. 2(3), p. 811-822). Interkalací mezi báze DNA se komplikuje transkripce a následně i translace a množení buněk. Z klinicky významných interkalátorů možno uvést např. doxorubicin, mithoxanthron, aktinomyciny.

Předpokladem pro interkalační účinek je přítomnost relativně velké planární části molekuly, nejčastěji tri- a víceocyklického útvaru, skládajícího se z sp^2 hybridizovaných atomů uhlíku, případně stericky odpovídajících heteroatomů. Interkalační účinek je pak často podpořen přítomností polární části molekuly (sacharidu nebo analogické struktury), která díky hydroxylovým skupinám a aminoskupinám vytváří vodíkové můstky k interkalované DNA a „kotví“ tak interkalátor.

Co se týče použití v molekulární biologii, je z interkalátorů možné zmínit např. ethidium bromid. Interkalátory mají výhodu v silnější stabilizaci duplexu DNA.

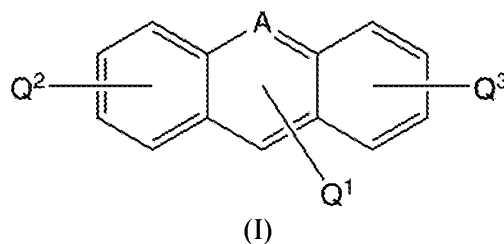
Přetrvává potřeba uvést do praktického použití sloučeniny interkalující DNA či vázající se do malého žlábků dvoušroubovice DNA, které by byly flexibilní, ale zároveň snadno připravitelné, s relativně malou molekulou, nízkou molekulovou hmotností a konjugovatelné na oligonukleotidové sondy.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou deriváty akridinu a antracenu, které odstraňují uvedené nedostatky dosavadního stavu techniky. Vynálezem je použití látek obecného vzorce (I) jako sloučenin pro zvýšení teploty tání dvoušroubovice DNA. Jedná se o bazické molekuly na bázi substituovaného aromatického jádra, výhodně substituovaného karboxamidovou skupinou obsahující uhlíkatý řetězec zakončený bazickou funkcí a řetězcem zakončeným azidoskupinou sloužící ke kovalentní

vazbě příkladně na oligonukleotidovou sondu. Modifikace jádra slouží k upevnění vazby na dvoušroubovici DNA pomocí vodíkových vazeb s dusíkem a kyslíkem guaninu, dále pak pomocí vodíkové vazby amidického vodíku přes molekulu vody na fosfátovou skupinu mezi příslušným guanosinem a sousedním nukleosidem. Dále jsou vynálezem látky obecného vzorce (I), které ve své molekule obsahují vždy substituent zakončený azidoskupinou sloužící k azido-alkynové cykloadici (takzvané click reakci) na vhodně modifikovaný řetězec příkladně oligonukleotidu. Jedná se o zpravidla bazické molekuly na bázi aromatického jádra substituovaného uhlíkatými řetězci zakončenými bazickou funkcí.

Vynález se týká použití derivátů akridinu a antracenu obecného vzorce (I):



kde:

A je $-N=$, nebo $-CH=$;

substituenty Q^1 , Q^2 a Q^3 navázané v kterékoli volné poloze tricyklického jádra jsou nezávisle na sobě vybírány ze skupiny zahrnující: $-H$, $-NH_2$ a $-X-(CH_2)_n-T$, kde:

X je $-O-$, $-S-$, $-CH_2-$, $-CONH-$, $-NH-$ nebo $-NR^1-$, kde R^1 je alkyl nebo aryl;

n je celé číslo od 0 do 10;

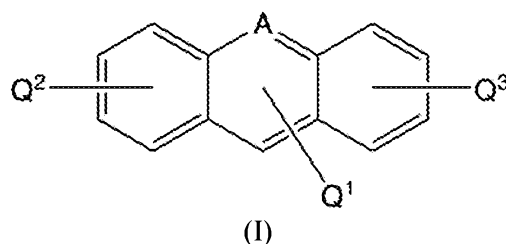
T je $-N_3$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-CONHR^2$, $-CONR^2R^3$, $-COOR^2$, $-NH_2$,

$-NHR^2$, $-NR^2R^3$, $-SH$, $-NCS$, $-CO-O-L$, kde R^2 a R^3 jsou nezávisle na sobě alkyl nebo aryl a L je *N*-sukcinimidinyl, 1-pentafluorfenyl, 3-sulfo-*N*-sukcinimidinyl, 1-(4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorofenyl) nebo odpovídající sodné soli;

a dále jejich solí vzniklých reakcí s HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 nebo HNO_3 ke zvýšení pevnosti vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se interakce a k ovlivnění teploty tání vznikajícího duplexu.

Sloučeniny obecného vzorce (I) lze tedy použít dle vynálezu jako látky zvyšující teplotu tání dvoušroubovice DNA. Jejich předností je nízká molekulová hmotnost, bazicita, a tedy možnost tvorby ve vodě velmi dobře rozpustných solí, flexibilita a vysoká stabilizace duplexu DNA. Lze je použít například v kombinaci s vhodnými dvojicemi oligonukleotidů jako systém interní kontroly v analýze teploty tání pro real-time PCR, kde má význam sledovat vliv látek v reakci na teplotu tání (např. u analýz genetických polymorfismů), přičemž sekvence oligonukleotidů se volí tak, aby nebyly komplementární s DNA sekvencemi běžně se vyskytujícími v přírodě. Sloučeniny je dále možné použít v kombinaci s dvojicemi vhodných oligonukleotidů například v metodách srovnání vlivu dalších sloučenin na zvýšení teploty tání duplexu a experimentech zjišťujících závislost vlivu na zvýšení teploty tání duplexu na sekvenci oligonukleotidů.

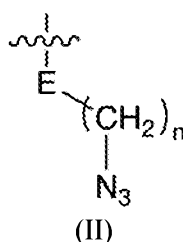
Vynález se dále týká derivátů akridinu a antracenu obecného vzorce (I):



kde:

A je -N=, nebo -CH=;

substituent Q^1 navázaný v kterékoli volné poloze tricyklického jádra představuje skupinu obecného vzorce (II):



kde:

n je celé číslo od 0 do 10;

E je -S-, -O-, -CH₂-, -NH- nebo -NR¹-, kde R¹ je alkyl nebo aryl;

dále substituenty Q^2 a Q^3 navázané v kterékoli volné poloze tricyklického jádra jsou nezávisle na sobě vybírány ze skupiny zahrnující: -H, -NH₂ a -X-(CH₂)ₙ-T, kde:

X je -CONH-, -O-, -S-, -CH₂-, -NH- nebo -NR²-, kde R² je alkyl nebo aryl,

n je celé číslo od 0 do 10,

T je -COOH, -CONH₂, -CONHR³, -CONR³R⁴, -COOR³, -NH₂, -NHR³ nebo -NR³R⁴, kde R³ a R⁴ jsou nezávisle na sobě alkyl nebo aryl,

a dále jejich solí vzniklých reakcí s HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ nebo HNO₃.

Sloučeniny obecného vzorce (I) obsahující ve své molekule azidoskupinu dle vynálezu jsou, mimo použití popsané výše, současně vhodné pro připojení kovalentní vazbou příkladně na oligonukleotidové sondy. Vzniklé struktury je možné následně využít při zjišťování bodových mutací v genech.

Objasnění výkresů

Na obrázku č. 1 je vyobrazen graf zvýšení teploty tání duplexu DNA v závislosti na koncentraci testované sloučeniny (III).

Na obrázku č. 2 je vyobrazen graf zvýšení teploty tání duplexu DNA v závislosti na koncentraci testované sloučeniny (IV).

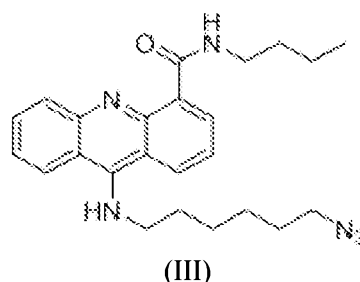
Na obrázku č. 3 je vyobrazen graf zvýšení teploty tání duplexu DNA v závislosti na koncentraci oligonukleotidu s navázanou sloučeninou (III).

5 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad č. 1

Příklad č. 1 demonstruje přípravu a charakterizaci sloučeniny vzorce (III).

10



15 K bezvodému uhličitanu draselnému (5 g) se přidá kyselina anthranilová (6,8 g) a kyselina 2-chlorbenzoová (7,8 g). Do směsi se přidá isoamylalkohol (70 ml) a katalytické množství práškové mědi. Směs se 24 h míchá při teplotě 140 °C. Poté se ze směsi za sníženého tlaku oddestiluje isoamylalkohol a surový produkt se převede do horké vody (1 l). Směs se míchá a zahřívá do rozpuštění produktu. Následně se do směsi přidává koncentrovaná kyselina chlorovodíková do kyselé reakce. Vzniklá sraženina se odsaje a promyje horkou vodou (0,5 l).
 20 Sraženina se rozpustí v 1M NaOH a za míchání a zahřívání se přidá aktivní uhlí (0,5 g). Směs se přefiltruje a k filtrátu se přidá koncentrovaná kyselina chlorovodíková. Sraženina se odsaje, promyje horkou vodou (0,5 l) a vysuší. Vysušená sraženina se rozpustí za horka v 96% ethanolu (1 l). Za míchání se přidá destilovaná voda do stálého zakalení. Směs se ponechá k vysrážení 20 h. Vzniklá sraženina se odsaje a vysuší. Připraví se 5,14 g jemně žluté, pevné krystalické látky, což
 25 odpovídá výtěžku 32 %.

K 2,2'-iminodibenzoové kyselině (7,78 g, 30,24 mmol) se přidá POCl₃ (90 ml), směs se míchá 1 h při 140 °C pod zpětným chladičem. Poté se do směsi ochlazené na 50 °C pomalu přidává bezvodý MeOH (100 ml) po dobu 2 h. Poté se do směsi přidává POCl₃ do rozpuštění krystalů a směs se
 30 míchá 12 h. Přebytný MeOH se ze směsi oddestiluje a vzniklé krystaly se odsají a rekrystalizují z horkého MeOH. Krystaly se odsají, promyjí ledovým MeOH a vysuší. Získá se 6,1 l g hnědožluté krystalické látky, což odpovídá výtěžku 79 %.

K methylesteru kyseliny 9-oxoakridan-4-karboxylové (2,06 g, 8,13 mmol) se přidá SOCl₂ (8 ml) a katalytické množství DMF. Směs se míchá při teplotě 80 °C pod zpětným chladičem. Poté se ze směsi oddestiluje SOCl₂ za sníženého tlaku. Do surového produktu se přidá suchý fenol (7,75 g, 82,35 mmol) a směs se zahřeje na 110 °C po dobu 15 minut. Poté se teplota sníží na 55 °C a do směsi se přidá 6-azidoheptyl-1-amin (2,95 g, 20,74 mmol). Směs se míchá při stejné teplotě 24
 40 hodin. Po ukončení reakce se směs převede do chloroformu a vytřepe 1x 2M roztokem hydroxidu sodného (85 ml). Organická vrstva se vysuší Na₂SO₄ a za sníženého tlaku se ze směsi oddestiluje chloroform. Produkt se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu (ethyl-acetát). Frakce s čistým produktem se odpaří. Získá se 2,42 g hnědooranžové krystalické látky, což odpovídá výtěžku 94 %.

45 K roztoku methylesteru 9-[(6-azidoheptyl)amino]akridin-4-karboxylové kyseliny (2 g, 5,30 mmol) v THF se přidá nasycený roztok NaOH v směsi MeOH/H₂O 5:1 v nadbytku. Směs se míchá 1 h při laboratorní teplotě. Poté se ze směsi oddestilují organická rozpouštědla za sníženého tlaku. Směs se rozpustí ve vodě (100 ml) a vytřepe 3x chloroformem (80 ml). Organická vrstva se vysuší

Na₂SO₄ a směs se zahustí za sníženého tlaku. Poté se směs vytřepe 10% HCl a organická vrstva se vysuší Na₂SO₄ a odpaří za sníženého tlaku. Produkt se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu (chloroform/methanol 4:1). Získá se 1,44 g žlutooranžové krystalické látky, což odpovídá výtěžku 74 %.

5

K roztoku 9-[(6-azidoheptyl)amino]akridin-4-karboxylové kyseliny (150 mg, 0,413 mmol) v bezvodém dichlormethanu se přidá HBTU (313 mg, 0,826 mmol) a triethylamin (89 mg, 0,826 mmol). Směs se míchá za laboratorní teploty 10 minut. Do směsi se přidá butylamin (27 mg, 0,371 mmol) a směs se míchá 2 hodiny za laboratorní teploty. Po ukončení reakce se ze směsi oddestiluje dichlormethan za sníženého tlaku. Produkt se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu (chloroform/methanol 9:1). Získá se 78 mg žluté olejovité látky, což odpovídá výtěžku 50 %.

10

IČ (ATR) $\nu_{\max}$ = 3358, 2932, 2861, 2095, 1639, 1617, 1593, 1560, 1532, 1503, 1476, 1435, 1423, 1371, 1357, 1328, 1273, 1254, 1211, 1187, 1149, 1127, 1094, 1027, 956, 918, 848, 822, 763, 746, 736, 680, 657, 630, 617 cm⁻¹.

15

¹H NMR (500 MHz, aceton) δ 12,29 (s, 1H); 8,78 (s, 1H); 8,54 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 8,43 (d, J = 8,8 Hz, 1H); 7,98 (s, 1H); 7,76 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,43 (q, J = 9,1, 8,0 Hz, 2H); 6,91 – 6,79 (m, 1H); 3,97 (t, J = 7,2 Hz, 2H); 3,61 (q, J = 6,3 Hz, 2H); 3,27 (t, J = 6,9 Hz, 2H); 1,89 (p, J = 7,3 Hz, 2H); 1,77 (p, J = 7,0 Hz, 2H); 1,67 – 1,51 (m, 5H); 1,51 – 1,35 (m, 4H); 1,04 (t, J = 7,4 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, aceton) δ 166,33; 154,38; 135,00; 131,65; 129,68; 128,33; 124,54; 123,68; 122,01; 117,21; 116,30; 114,72; 51,79; 51,32; 39,74; 32,61; 31,63; 30,33; 29,31; 27,03; 21,19; 14,12.

20

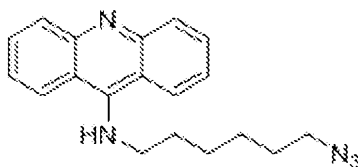
HRMS: m/z 419,2562 [M+H]⁺

25

Příklad č. 2

Příklad č. 2 demonstruje přípravu a charakterizaci sloučeniny vzorce (IV).

30



(IV)

K suspenzi kyseliny 2-chlorbenzoové (20,46 g) a bezvodého uhličitanu draselného (18,05 g) v isoamylalkoholu (120 ml) se za míchání přidá anilin (12 ml). Do směsi se přidá katalytické množství práškové mědi. Směs se 24 h míchá při teplotě 140 °C. Poté se ze směsi za sníženého tlaku oddestiluje isoamylalkohol a surový produkt se rozpustí v 1M NaOH. Roztok se převede do horké vody (1 l). Následně se do směsi přidává 35% HCl do kyselé reakce. Vzniklá sraženina se odsaje a promyje horkou vodou (0,5 l). Sraženina se rozpustí v 1M NaOH a za míchání a zahřívání se přidá aktivní uhlí (1 g). Směs se přefiltruje a k filtrátu se přidá koncentrovaná kyselina chlorovodíková. Sraženina se odsaje, promyje horkou vodou (0,5 l) a vysuší. Vysušená sraženina se rozpustí za horka v 96% ethanolu (300 ml). Za míchání se přidává destilovaná voda do stálého zakalení. Směs se ponechá k vysrážení 20 h. Vzniklá sraženina se odsaje a vysuší. Produkt se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu (1. CHCl₃, 2. CHCl₃:MeOH 4:1). Frakce s čistým produktem se odpaří. Získá se 11,96 g čisté nažloutlé krystalické látky, což odpovídá výtěžku 43 %.

45

K 2-(fenylamino)benzoové kyselině (1,00 g) se přidá POCl₃ (10 ml), směs se míchá 1 h při 140 °C pod zpětným chladičem. Poté se ze směsi za sníženého tlaku oddestiluje přebytečný POCl₃. Do surového produktu se přidá suchý fenol (4,42 g) a směs se zahřeje na 110 °C po dobu 15 minut.

50

Poté se teplota sníží na 55 °C a do směsi se přidá 6-azidoheptyl-1-amin (1,34 g, 9,41 mmol). Směs se míchá při stejné teplotě 24 hodin. Po ukončení reakce se směs převede do chloroformu a vytřepe 1x 2M roztokem hydroxidu sodného (50 ml). Organická vrstva se vysuší Na_2SO_4 a za sníženého tlaku se ze směsi oddestiluje chloroform. Produkt se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu (ethyl-acetát). Frakce s čistým produktem se odpaří. Získá se 282,3 mg hnědooranžové olejovité látky, což odpovídá výtěžku 19 %.

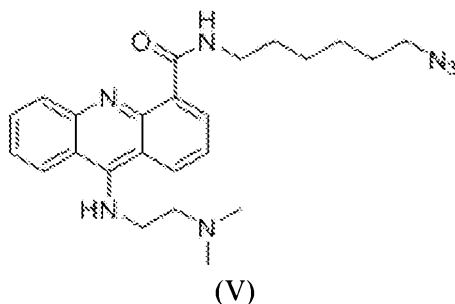
IČ (ATR) ν_{max} = 3188, 3030, 2934, 2859, 2788, 2094, 1635, 1588, 1569, 1535, 1473, 1362, 1340, 1272, 1191, 1170, 1143, 1115, 1091, 1036, 953, 869, 748, 733, 698, 661, 640, 632 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,45 (d, J = 8,6 Hz, 2H); 8,07 (d, J = 8,5 Hz, 2H); 7,48 (t, J = 7,7 Hz, 2H); 7,21 (t, J = 7,8 Hz, 2H); 4,06 (t, J = 7,5 Hz, 2H); 3,47 (s, 1H); 3,18 (t, J = 6,8 Hz, 2H); 2,04 (p, 2H); 1,57 – 1,49 (m, 2H); 1,49 – 1,42 (m, 2H); 1,42 – 1,34 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 156,62; 140,30; 133,58; 125,22; 122,93; 119,68; 112,49; 51,07; 48,57; 29,80; 28,51; 26,29; 26,18;

HRMS: m/z 320,1880 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Příklad č. 3

Příklad č. 3 demonstruje přípravu a charakterizaci sloučeniny vzorce (V).



K methylesteru kyseliny 9-oxoakridan-4-karboxylové (0,5 g, 1,97 mmol) se přidá SOCl_2 (1 ml) a katalytické množství DMF. Směs se míchá při teplotě 80 °C pod zpětným chladičem. Poté se ze směsi oddestiluje SOCl_2 za sníženého tlaku. Do surového produktu se přidá suchý fenol (1,86 g, 19,74 mmol) a směs se zahřeje na 110 °C po dobu 15 minut. Poté se teplota sníží na 55 °C a do směsi se přidá 2-dimethylaminoethylamin (434 mg, 4,92 mmol). Směs se míchá při stejné teplotě 24 hodin. Po ukončení reakce se směs převede do chloroformu a vytřepe 1x 2M roztokem hydroxidu sodného (20 ml). Organická vrstva se vysuší Na_2SO_4 a odpaří. Produkt se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu (hexan:ethyl-acetát 7:3). Frakce s čistým produktem se odpaří.

K roztoku methylesteru 9-{{2-(dimethylamino)ethyl}amino}akridin-4-karboxylové kyseliny (63 mg, 0,195 mmol) v THF se přidá nasycený roztok NaOH ve směsi MeOH/ H_2O 5:1 v nadbytku. Směs se míchá 1 h při laboratorní teplotě. Poté se ze směsi oddestilují organická rozpouštědla za sníženého tlaku. Směs se rozpustí ve vodě a vytřepe 3x chloroformem. Organické vrstvy se spojí a vysuší Na_2SO_4 . Směs se zahustí za sníženého tlaku. Poté se směs vytřepe 10% HCl a organická vrstva se vysuší Na_2SO_4 a odpaří za sníženého tlaku. Produkt se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu.

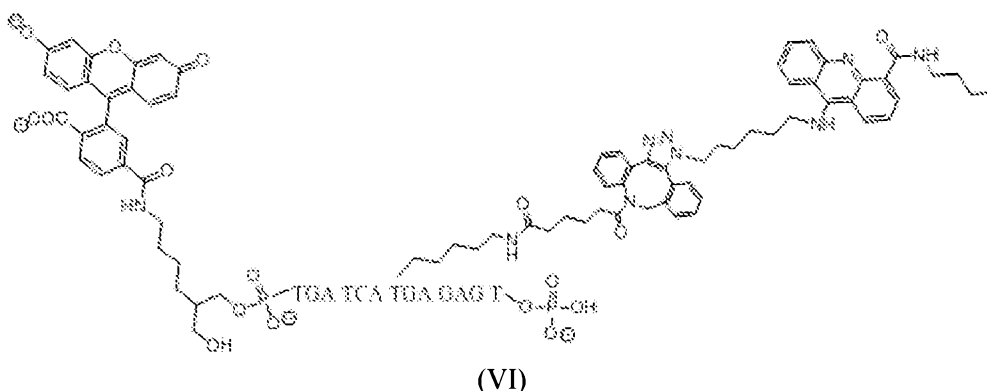
K roztoku 9-{{2-(dimethylamino)ethyl}amino}akridin-4-karboxylové kyseliny (150 mg, 0,485 mmol) v bezvodém dichlormethanu se přidá HBTU (368 mg, 0,97 mmol) a triethylamin (98 mg, 0,97 mmol). Směs se na 15 minut vloží do ultrazvukové lázně. Poté se do směsi přidá 6-azidoheptylamin (0,485 mmol) a směs se míchá 2 hodiny za laboratorní teploty. Po ukončení reakce

se ze směsi oddestiluje dichlormethan za sníženého tlaku. Produkt se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 12,51 (s, 1H); 8,87 (d, J = 7,1; 1,4 Hz, 1H); 8,29 (d, J = 8,7; 1,5 Hz, 1H); 8,18 (d, J = 8,8; 0,9 Hz, 1H); 7,93 (d, J = 8,7; 1,3 Hz, 1H); 7,71 (t, J = 8,3; 6,6; 1,3 Hz, 1H); 7,45 – 7,34 (m, 2H); 7,14 (s, 1H); 3,91 (t, J = 5,8 Hz, 2H); 3,68 (q, J = 6,9; 5,3 Hz, 2H); 3,28 (t, J = 7,0 Hz, 2H); 2,82 – 2,76 (m, 2H); 2,69 (q, J = 7,1 Hz, 4H); 1,83 (p, J = 7,0 Hz, 2H); 1,70 – 1,57 (m, 4H); 1,57 – 1,47 (m, 2H); 1,13 (t, J = 7,1 Hz, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 166,54; 152,91; 147,87; 147,43; 134,59; 130,57; 128,98; 127,91; 126,81; 123,03; 122,80; 121,51; 116,13; 115,26; 52,18; 51,40; 46,37; 46,07; 39,55; 29,66; 29,50; 28,81; 27,01; 26,54; 11,87.

Příklad č. 4

Příklad č. 4 demonstruje přípravu a charakterizaci oligonukleotidu vzorce (VI) s navázanou DNA interkalující molekulou vzorce (III) metodou click reakce.



Oligonukleotid se syntetizuje na syntetizéru DNA/RNA ABI 394, v průběhu syntézy se s využitím standardních komerčních monomerů provede modifikace fosfátem na 3'-konci, 6-karboxyfluoresceinem (6-FAM) na 5'-konci a v pozici 7 se inkorporuje deoxythymidin modifikovaný dibenzocycloooktynem.

Syntetizovaný oligonukleotid se ponechá neodštěpený na pevné fázi. 0,01 mmol molekuly vzorce (III) se rozpustí v 0,2 ml methanolu, přidá se 6 mg pevné fáze s navázaným DBCO modifikovaným oligonukleotidem (200 nmol) a třepe se za laboratorní teploty na třepače přes noc.

Poté se roztok molekuly vzorce (III) v methanolu odpipetuje a pevná fáze se promyje opakovaně methanolem a dichlormethanem, dokud není rozpouštědlo bezbarvé. Pak se pevná fáze vysuší, přidá se 0,5 ml 50mM roztoku K₂CO₃ v methanolu a třepe se za laboratorní teploty na třepače 8 hodin.

Methanolickeý roztok se poté odpipetuje od pevné fáze, k ní se přidá 0,5 ml vody, protřepe se, voda se opět odpipetuje a přidá se k methanolickeému roztoku odblokovaného oligonukleotidu. Vznikne tak 1 ml roztoku, který se následně zbaví nízkomolekulárních vedlejších produktů gelovou chromatografií. Roztok surového oligonukleotidu z gelové chromatografie se pak odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v definovaném objemu příslušného rozpouštědla a přečistí se na HPLC.

Pro analýzu modifikovaných oligonukleotidových sond se aplikuje chromatografická metoda, která umožňuje také semi-preparativní purifikaci, a to při následujících separačních podmínkách: kolona Luna-PhenylHexyl 150×3,0 mm, 5 μm, izokratická eluce s využitím mobilní fáze ACN:TEAA (83:17, v/v).

Charakterizace připraveného modifikovaného oligonukleotidu:

spočítaná MW = 5534,36

MS (MALDI-TOF): klastr s hlavním píkem m/z 5536 $[M+H]^+$.

5

Příklad č. 5

Příklad č. 5 demonstruje metodu stanovení vlivu látek obecného vzorce (I) na zvýšení teploty tání duplexu DNA.

10

Metoda se provádí ve vodném prostředí za přítomnosti pufru pro Taq polymerasu používaném běžně pro PCR. V roztoku jsou přítomny 2 navzájem komplementární oligonukleotidy. Jeden je značen fluoroforem na 5'-konci (FAM) a druhý zhášecem na 3'-konci (BHQ-1). Stanovení teploty tání duplexu se provádí v přístroji pro real-time PCR, kde dochází k postupnému zvyšování teploty ze stavu, kdy jsou oligonukleotidy vázány v duplexu, až do teploty, kdy jsou oligonukleotidy denaturovány. Denaturace je doprovázena zvýšením fluorescence, neboť vzdálenost mezi zhášecem a fluoroforem je v denaturovaném stavu větší a nedochází ke zhášení fluoroforu zhášecem.

15

Zvyšování teploty tání probíhá v nárůstu 0,2 °C/ 5 s v předem stanoveném teplotním intervalu (40–80 °C), který odpovídá použitému testovacímu systému. Ve stejných intervalech je pak měřena fluorescence v každé z 96 jamek destičky. Výsledkem je záznam, kdy na ose x je teplota a na ose y fluorescence. Derivací změny fluorescence podle teploty získáme graf, kde maximum píku odpovídá teplotě tání duplexu.

20

Na téže destičce se vyhodnocuje škála koncentrací testované látky v rozsahu 100 µM až 20 nM proti kontrole, kterou je vzorek bez obsahu testované látky. Testované látky lze poté mezi sebou porovnávat dle koncentrace, ve které účinně zvyšují teplotu tání.

25

Příklad č. 6

Příklad č. 6 demonstruje metodu stanovení vlivu látek obecného vzorce (I) vázaných na sekvenci oligonukleotidu na zvýšení teploty tání duplexu DNA.

Pro otestování vlivu navázané modifikace na oligonukleotid se testy provádí obdobně jako v případě testu modifikací volně v roztoku. V reakci jsou přítomny 2 navzájem komplementární oligonukleotidy. Jeden je značen fluoroforem na 5'-konci (FAM) a druhý zhášecem na 3'-konci (BHQ-1). Testovaná modifikace je umístěna ve vybrané pozici fluoroforového oligonukleotidu. Stanovení teploty tání duplexu se provádí v přístroji pro real-time PCR, kde dochází k postupnému zvyšování teploty ze stavu, kdy jsou oligonukleotidy vázány v duplexu, až do teploty, kdy jsou oligonukleotidy denaturovány. Denaturace je doprovázena zvýšením fluorescence, neboť vzdálenost mezi zhášecem a fluoroforem je v denaturovaném stavu větší a nedochází ke zhášení fluoroforu.

35

Zvyšování teploty tání probíhá v nárůstu 0,2 °C/ 5 s v předem stanoveném teplotním intervalu (40–80 °C), který odpovídá použitému testovacímu systému. Ve stejných intervalech je pak měřena fluorescence v každé z 96 jamek destičky. Výsledkem je záznam, kdy na ose x je teplota a na ose y fluorescence. Derivací změny fluorescence podle teploty získáme graf, kde maximum píku odpovídá teplotě tání duplexu.

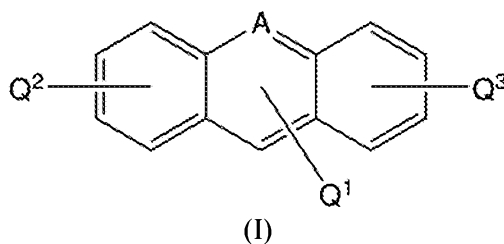
40

Na téže destičce se křížově vyhodnocuje koncentrace oligonukleotidu se zhášecem (0,4 resp. 0,2 µM v reakci) a s fluoroforem (0,3 resp. 0,15 µM). Navzájem jsou porovnávány oligonukleotidy s navázanou modifikací i proti kontrole bez modifikace.

50

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití derivátů akridinu a antracenu obecného vzorce (I):



kde:

A je -N=, nebo -CH=;

substituenty Q^1 , Q^2 a Q^3 navázané v kterékoli volné poloze tricyklického jádra jsou nezávisle na sobě vybírány ze skupiny zahrnující: -H, -NH₂ a -X-(CH₂)_n-T, kde:

X je -O-, -S-, -CH₂-, -CONH-, -NH- nebo -NR¹-, kde R¹ je alkyl nebo aryl;

n je celé číslo od 0 do 10;

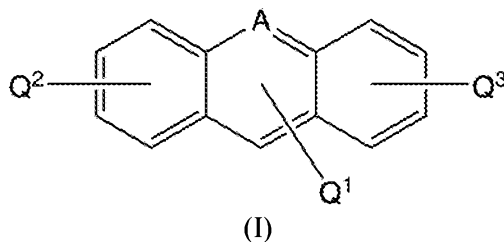
T je -N₃, -COOH, -CONH₂, -CONHR², -CONR²R³, -COOR², -NH₂, -NHR²,

-NR²R³, -SH, -NCS, -CO-O-L, kde R² a R³ jsou nezávisle na sobě alkyl nebo aryl a L je *N*-sukcinimidinyl, 1-pentafluorfenyl, 3-sulfo-*N*-sukcinimidinyl,

1-(4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorofenyl) nebo sodný kation;

a dále jejich soli vzniklých reakcí s HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ nebo HNO₃ ke zvýšení pevnosti vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se interakce a k ovlivnění teploty tání vznikajícího duplexu.

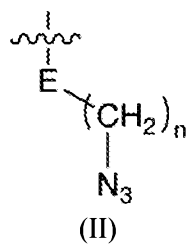
2. Deriváty akridinu a antracenu obecného vzorce (I):



kde:

A je -N=, nebo -CH=;

substituent Q^1 navázaný v kterékoli volné poloze tricyklického jádra představuje skupinu obecného vzorce (II):



kde:

5

n je celé číslo od 0 do 10;

E je $-S-$, $-O-$, $-CH_2-$, $-NH-$ nebo $-NR^1-$, kde R^1 je alkyl nebo aryl;

10

dále substituenty Q^2 a Q^3 navázané v kterékoli volné poloze tricyklického jádra jsou nezávisle na sobě vybírány ze skupiny zahrnující: $-H$, $-NH_2$ a $-X-(CH_2)_n-T$, kde:

X je $-CONH-$, $-O-$, $-S-$, $-CH_2-$, $-NH-$ nebo $-NR^2-$, kde R^2 je alkyl nebo aryl;

15

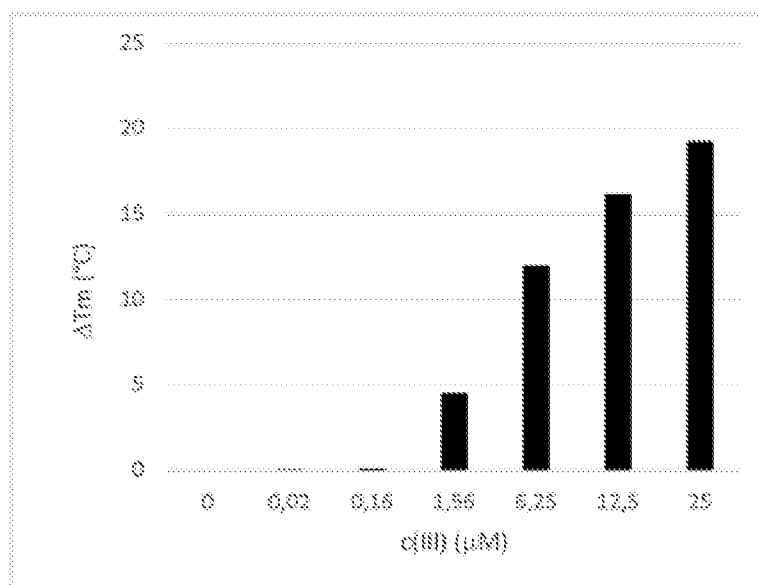
n je celé číslo od 0 do 10;

T je $-COOH$, $-CONH_2$, $-CONHR^3$, $-CONR^3R^4$, $-COOR^3$, $-NH_2$, $-NHR^3$ nebo $-NR^3R^4$, kde R^3 a R^4 jsou nezávisle na sobě alkyl nebo aryl;

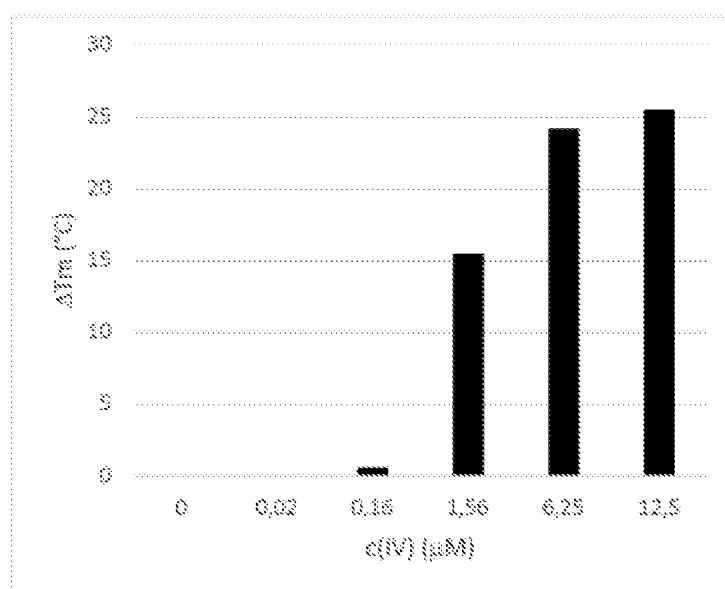
20

a dále jejich soli vzniklé reakcí s HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 nebo HNO_3 .

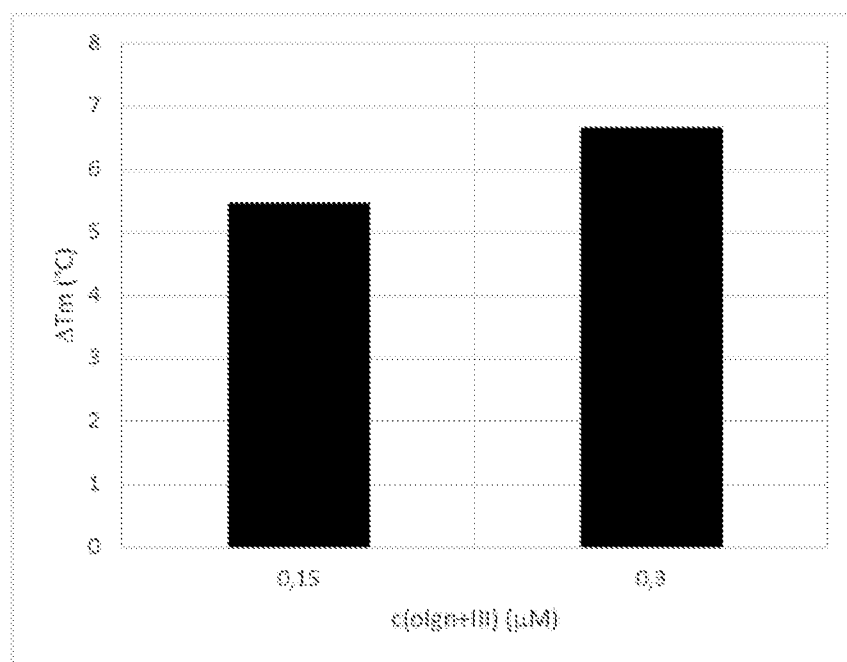
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3