

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2011-782**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.12.2011**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2013**  
(Věstník č. 24/2013)

(51) Int. Cl.:

**C07D 417/14** (2006.01)  
**C07D 417/06** (2006.01)  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 401/06** (2006.01)  
**C07D 413/14** (2006.01)  
**C07D 413/06** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**C09K 11/06** (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 6,  
CZ  
Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR, Praha 4,  
CZ  
Univerzita Karlova v Praze I. Lékařská Fakulta, Praha 2,  
CZ

(72) Původce:

Král Vladimír Prof. RNDr. DrSc., Praha 2, CZ  
Bříza Tomáš Ing. Ph.D., Praha 4, CZ  
Kejík Zdeněk Ing. Ph.D., Sokolov, CZ  
Králová Jarmila RNDr. CSc., Praha 2, CZ  
Rimpelová Silvie Ing., Doksy, CZ  
Ruml Tomáš Prof. Ing. CSc., Praha 10, CZ  
Martásek Pavel Prof. MUDr., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:

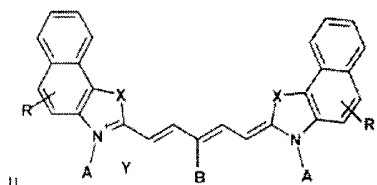
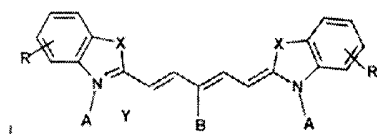
Ing. Květoslava Kubíčková, Doubravčická 2201, Praha  
10, 10000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Využití polymethiniových solí jako  
mitochondriálních sond**

(57) Anotace:

Využití polymethiniových solí obecného vzorce I a II, kde význam obecných substituentů je uveden v popisné části, pro přípravu selektivních buněčných sond pro značení mitochondrií a to jak v živých, tak i v mrtvých buňkách.



## Využití polymethiniových solí jako mitochondriálních sond

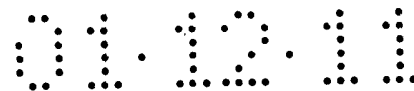
### Oblast techniky

Vynález se týká použití systémů založených na polymethiniových solích. Tyto systémy lze využít v oblasti selektivní intracelulární lokalizace. Systémy jsou založeny na použití strukturního motivu polymethiniových solí připravených z příslušných malondialdehydů.

### Dosavadní stav techniky

Mitochondrie jsou semiautonomní dynamické, pleomorfní organely (DiMauro, S., Schon, A. E. (2003): **Mitochondrial respiratory chain diseases**, *N. Engl. J. Med.* 348, 2656–2668), které tvoří až 40 % cytoplazmy metabolicky aktivních eukaryotických buněk. Dynamika mitochondrií je dána jejich konstantním pohybem včetně jejich neustálého dělení a fúzí, což je doprovázeno změnami ve velikosti, tvaru, počtu a hmotě mitochondrií. (Nisoli, E., Carruba, M. O. (2006): **Nitric oxide and mitochondrial biogenesis**. *J. Cell Sci.* 119, 2855–2862).

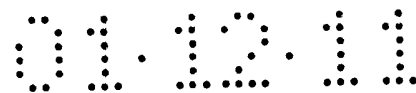
Hlavní rolí mitochondrií v buňce je produkce energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) prostřednictvím elektronového transportního řetězce [ETC]. (Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, C. I., Nierlich, D. P., Roe, A. B., Sanger, F., Schreier, H. P., Smith, A. J., Staden, R., Young, G. O. (1981): **Sequence and organization of the human mitochondrial genome**. *Nature* 290, 457-465). Kromě produkce energie hrají mitochondrie klíčovou roli v řadě dalších funkcí týkajících se zprostředkování buněčné smrti apoptózy, termogeneze, translace a transkripce mitochondriálních genů. (Leonard, J. V., Schapira, A. H. V. (2000): **Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects**. *Lancet* 355, 299–304). Navíc jsou v nich lokalizovány některé metabolické procesy, jako je např. beta-oxidace, citrátový cyklus, degradace aminokyselin, biosyntéza hemu, metabolismus steroidů, močovinový cyklus, (Mancuso, M., Calsolaro, V., Orsucci, D., Carlesi, C., Choub, A., Piazza, S., Siciliano, G. (2009): **Mitochondria, cognitive impairment, and Alzheimer's disease**. *Int J Alzheimers Dis.* Jul 6; 951548), udržení buněčného redoxně-oxidačního potenciálu, homeostáze vápenatých iontů a další. (Di Lisa, F., Bernardi, P. (1998): **Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury**. *Mol Cell Biochem.* 184, 379–391).



Mitochondrie jsou křižovatkou na pomezí života a smrti buňky a jejich poškození je spojeno s řadou onemocnění. To je činí slibným cílem pro vývoj léků a nových terapeutických přístupů. (Anders, M. W., Robotham, J. L., Sheu, S. S. (2006): **Mitochondria: new drug targets for oxidative stress-induced diseases.** *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 2, 71-79). Kromě výše jmenovaných funkcí jsou mitochondrie hlavními producenty intracelulárních reaktivních kyslíkových částic, které vznikají jako vedlejší produkt oxidační fosforylace. Díky různým deficiencím v oxidační fosforylaci je sníženo zásobování buněk energií a je zvýšena produkce reaktivních kyslíkových částic, která může indukovat mutace a oxidativní poškození mitochondriální DNA. (Larsen, B. N., Ramussen, M., Ramussen, J. L. (2005): **Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways?** *Mitochondrion* 5, 89-108). Mnoho z těchto poškození mitochondriální DNA pravděpodobně přispívá ke vzniku rakoviny, stárnutí a neurodegenerativním onemocněním. (Bohr, A. V. (2002): **Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells.** *Free Radic. Biol. Med.* 32, 804–812).

Pro studium mitochondrií jsou využívány biochemické, genetické a elektron-mikroskopické přístupy. Pro studium aktivity mitochondrií v buňkách, je využíváno dvou přístupů založených na jejich značení *in situ* nebo izolaci mitochondrií uvolněných z buněk. Při jejich izolaci je tkáň mechanicky rozrušena a organely jsou purifikovány pomocí gradientové nebo diferenciální centrifugace. Izolované mitochondrie se však nemusejí chovat tak, jako za fyziologických podmínek a navíc může dojít ke zničení mitochondriální sítě. Během lyze buněk dochází k uvolnění buněčných komponent včetně v nich obsažených proteáz, což může vést ke zničení anebo snížené regeneraci organel. Vývoj fluorescenčních značících technik v kombinaci s mikroskopií umožnil studium komplexní struktury a funkce neporušených organel *in vivo*. Použitím sond je možné se vyvarovat izolaci a purifikaci organel a zachovat jejich strukturu. (Jakobs, S. (2006): **High resolution imaging of live mitochondria.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1763, 561–575). Nadějná je zejména mikroskopie buněk v reálném čase, která je nepostradatelným nástrojem pro objasnění časoprostorové mitochondriální dynamiky.

Obecně vzato jsou mitochondrie obtížně pozorovatelné pomocí fázového nebo Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu. Z tohoto důvodu je vyvíjena snaha nalézt vitální barviva pro specifické barvení mitochondrií v živých buňkách. Vstup většiny barviv do mitochondrií je závislý na membránovém potenciálu těchto organel v intaktním stavu. Některé z pozitivně nabitých, lipofilních fluorescenčních barviv mění svou emisi v závislosti na bezprostředním okolí a mohou být proto použity pro kvalitativní nebo dokonce

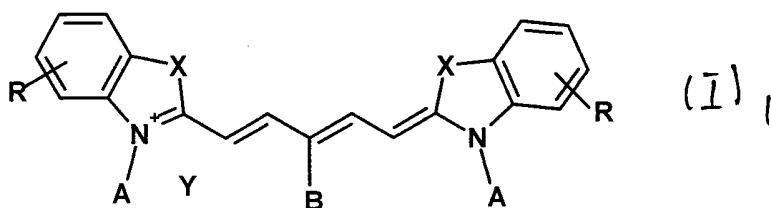


kvantitativní měření mitochondriálního membránového potenciálu. (Plasek, J., Sigler, K. (1996): **Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis.** *J. Photochem. Photobiol. B.* 33, 101–124). V současnosti jsou pro značení mitochondrií využívány zejména lipofilní kationické xantyliové deriváty jako tetrametylosamin, rhodamin 123, rhodamin 6G. (Rothe, G., Emmendörffer, A., Oser, A., Roesler, J., Valet, G. (1991): **Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123.** *J. Immunol. Methods* 138, 133-135). Nicméně potenciál těchto fluorescenčních barviv je značně limitován. Nevýhodami jsou jejich nízká fotostabilita, nevhodné spektrální vlastnosti a vysoká fototoxicita. Navíc dochází při fixaci mitochondrií k vymytí barviva z buněk díky ztrátě membránového potenciálu. (Poot, M., Zhang, Y. Z., Kramer, A. J., Wells, K. S., Jones, J. L., Hanzel, D. K., Lugade, A. G., Singer, L. V., Haugland, P. R. (1996): **Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains.** *J. Histochem. Cytochem.*, 44, 1363-1372).

#### Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody odstraňuje využití polymethinioých solí, které vykazují velmi výraznou fluorescenci a vysokou afinitu pro mitochondrie, jako mitochondriálních sond.

Předmětem vynálezu jsou dále nové dosud nepopsané polymethiniové sole obecného vzorce I,



kde obě koncové heteroaromatické skupiny methiniového řetězce jsou totožné a tvoří je heteroaromatické cykly odvozené od benzenu, jejichž konkrétní struktura je charakterizována skupinou A, B, X, Y a jednou nebo více skupinami R na obou koncích methiniové sole,

kde skupina A jsou alkyl C1 až C12 substituenty, glykolové řetězce s počtem glykolových (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) opakujících se jednotek 1 až 8 končící O-alkyl substituentem C1 až C12 nebo -OH skupinou, alkyl C1 až C8 sulfonové kyseliny nebo odpovídající jejich lithné nebo sodné, nebo draselné, nebo cesné, nebo rubidné sole, benzylová skupina, allylová

skupina, 8-substituovaný kobalt bis(dikarbollid) a nebo cyklodextrinový kruh různé velikosti ( $\alpha - \gamma$ ),

kde skupina B je aromatický nebo heteroaromatický kruh, případně oligoaromatický nebo oligoheteroaromatický kruh, který může být dále substituován jedním či více stejnými nebo různými substituenty vybranými ze skupiny: fluor, chlor, brom, jod, hydroxy-, trifluormetyl, O-metyl, O-etyl, O-propyl, O-trimetylsilyl, thiol, S-metyl, S-etyl, S-propyl, amino, N-metyl, N-etyl, N-propyl, N-butyl, N-dimethyl, N-dietyl, N-dipropyl, N-dibutyl, N-bocyl, nitril, karboxyl, karboxymetyl, karboxyetyl, karboxypropyl, karboxybutyl, nitroso, azid, kyanát,

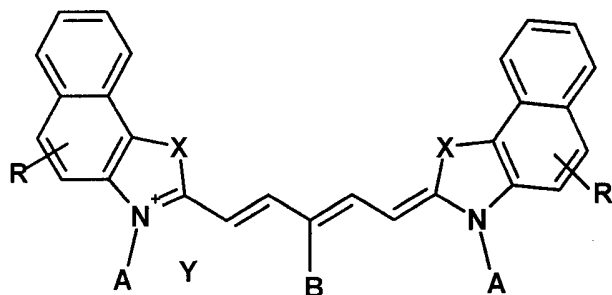
kde v případě dvojnásobně nabitých solí, skupinu B tvoří N-alkylamonium-heteroaromát, trialkylamoniový substituent nebo dialkylsulfoniový substituent, přičemž kvarternizace na atomu dusíku nebo síry je provedena skupinou A,

kde skupina R je fluor, chlor, brom, jod, hydroxy, trifluormetyl, O-trimetylsilyl, thiol, S-metyl, S-etyl, S-propyl, amino, N-metyl, N-etyl, N-propyl, N-butyl, N-dimethyl, N-dietyl, N-dipropyl, N-dibutyl, N-bocyl, nitril, karboxyl, karboxymetyl, karboxyetyl, karboxypropyl, karboxybutyl, nitroso, azid, kyanát, isokyanát, thiokyanát, isothiokyanát, N-alkyl, N-dialkyl substituent s C1 až C12 $\alpha$  řetězcem, alkyl C1 až C12 $\alpha$  substituent, O-alkyl C1 až C12 $\alpha$  substituent, glykolový řetězec s počtem glykolových jednotek 1 až 8 končící O-alkyl substituentem C1 až C12 $\alpha$  nebo -OH skupinou, 8-substituovaný kobalt bis(dikarbollid) a nebo cyklodextrinový kruh různé velikosti ( $\alpha - \gamma$ ),

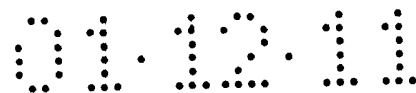
kde X je dusík, kyslík, síra, selen nebo dimethyl methylenová skupina,

kde Y je chlorid, bromid, jodid, metylsulfonát, toluensulfonát, nebo nonafluorbutylsulfonát

a polymethiniové sole obecného vzorce II,



(II),



kde obě koncové heteroaromatické skupiny methiniového řetězce jsou totožné a tvoří je heteroaromatické cykly odvozené od naftalenu a kde skupiny A, B, X, Y a R mají vpředu uvedený význam.

Předmětem vynálezu jsou polymethiniové sole obecného vzorce I a II, pro přípravu selektivních buněčných sond pro značení mitochondrií, a to jak v živých i mrtvých buňkách. Polymethiniové sole jsou navíc zadrženy v mitochondriích i po fixaci různými činidly (např. formaldehyd, glutaraldehyd), popř. permeabilizaci (aceton, metanol).

Předmětem vynálezu patentu jsou polymethiniové sole obecného vzorce I a II, pro přípravu sond pro značení izolovaných mitochondrií.

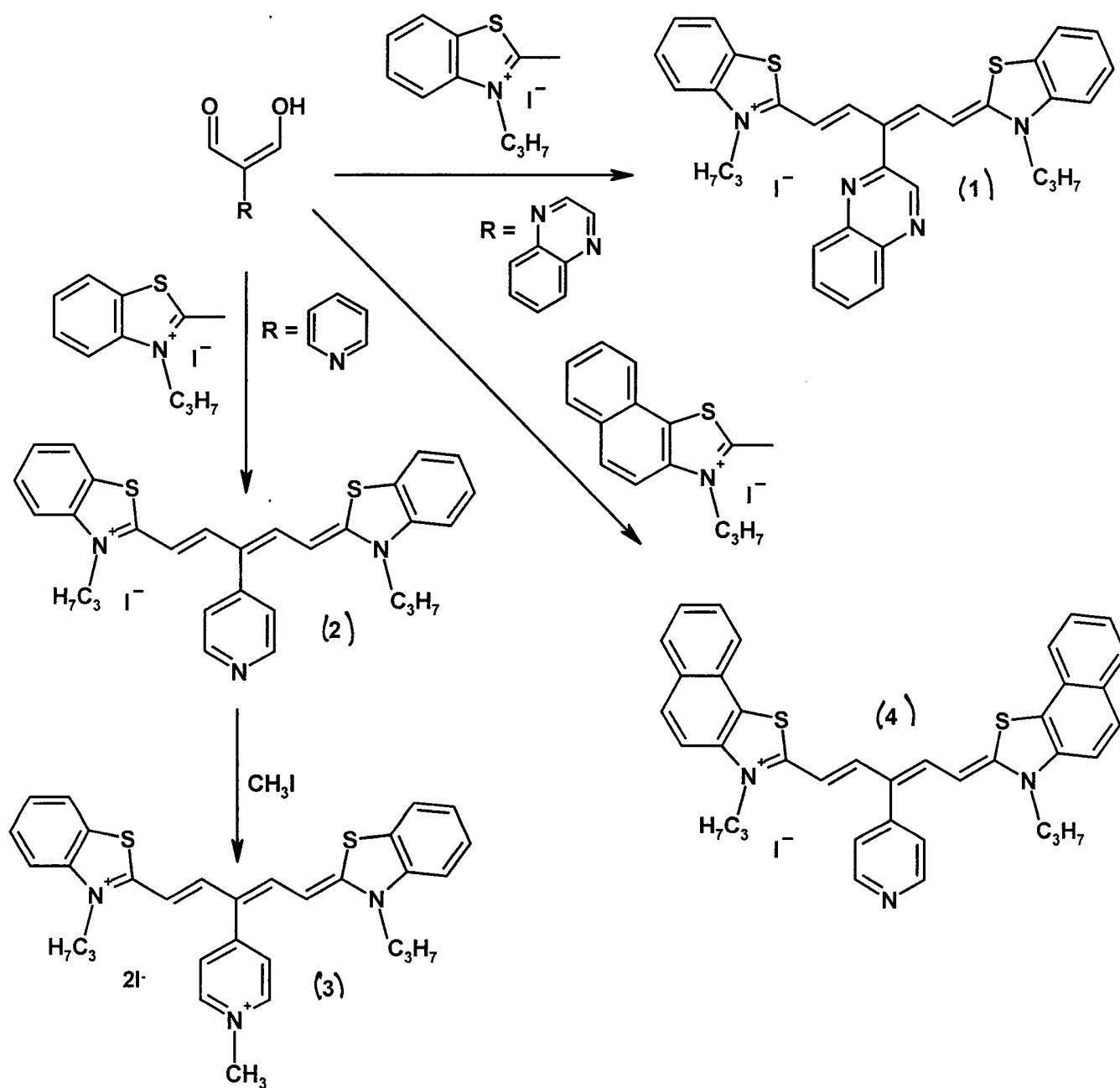
Zjistili jsme, že tyto sole vykazují velmi výraznou fluorescenci. *In vitro* studie těchto látek zaměřené na jejich intracelulární distribuci ukázaly jejich vysokou afinitu pro mitochondrie. Jejich mitochondriální lokalizace byla nalezena pro nejrůznější strukturní motivy těchto látek. Při vstupu, polymethiniových solí do mitochondrií dochází k jejich obarvení a díky jejich vysoké fluorescenci, jsou fluorescenčně značené mitochondrie snadno pozorovatelné a detekovatelné. Pro tento typ látek toto chování nebylo dosud pozorováno. Tento jev je způsoben jejich vysokou specifitou pro kardiolipin, který je hojně zastoupený ve vnitřní membráně mitochondrií.

Použití nových fluorescenčních vitálních barviv pro zobrazování mitochondrií by mohlo sloužit jako neinvazivní, finančně nenáročná a funkční alternativa komerčně dostupných barviv specifických pro mitochondrie. Tato barviva pro zobrazovací techniky mitochondrií by mohla být použita při studiu aktivity, morfologie a množství mitochondrií v buňce a sledování účinku farmakologických derivátů. Tyto sondy by tak umožnily monitorování klíčové intracelulární orgány v živých systémech v reálném čase a získat tak citlivý a specifický náhled do metabolismu, funkce, fyziologie a patofyziologie mitochondrií. Polymethiniové sole, které jsou předmětem tohoto patentu, jsou založeny na kondenzaci vhodného aromatického malondialdehydu se solí příslušného heteroaromátu (Schéma 1) tak, jak je příprava popsána pro podobné systémy. (Bříza, T., Kejík, Z., Císařová, I., Králová, J., Martásek, P., Král, V. (2008): **Optical sensing of sulphate by polymethinium salt receptors: Colorimetric sensor for heparin.** Chemical Communication. 1901-1903). Nesymetrické polymethiniové sole lze připravit dle námi již dříve popsaných postupů týkajících se podobných struktur (Bříza T., Kejík Z., Králová J., Martásek P., Král V. **Synthesis of unsymmetric cyanine dye via merocyanine and their interaction with DNA.** Coll. Czech. Chem. Comm. (2009), 74, 1081–1090) s tím rozdílem, že je pro jejich syntézu

využito neutrálního merocyaninového barviva, které je finálně kondenzováno se solí příslušného heteroaromátu (Schéma 1).

Dvakrát kvarternizované symetrické nebo nesymetrické polymethiniové sole se připravují tak, že se sůl kvarternizuje na příslušném heteroatomu do druhého stupně odpovídajícím alkylačním činidlem (Schéma 1).

Schéma 1



## Přehled obrázků

### Obrázek 1

Lokalizace látky **1** v mitochondriích buněk myšího karcinomu mléčné žlázy 4T1.

**a**, fázový kontrast; **b**, fluorescence látky **1**; **c**, fluorescence mitochondriální sondy MitoTracker Green<sup>FM</sup>; **d**, překryv snímků **b** a **c** znázorňující jejich shodnou lokalizaci v mitochondriích.

### Obrázek 2

Lokalizace látky **1** v mitochondriích v buněčné linii lidského osteosarkomu U2OS

**a**, fázový kontrast; **b**, fluorescence látky **1**; **c**, fluorescence jaderné sondy DAPI; **d**, překryv snímků **b** a **c**.

### Obrázek 3

Lokalizace látky **3** v mitochondriích primárních kuřecích fibroblastů CEF.

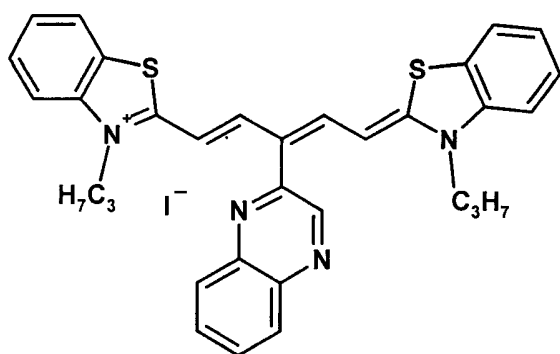
**a**, fázový kontrast; **b**, fluorescence látky **1**; **c**, fluorescence mitochondriální sondy MitoTracker Green<sup>FM</sup>; **d**, překryv snímků **b** a **c** znázorňující jejich shodnou lokalizaci v mitochondriích.

Vlastnosti a způsob přípravy nově připravených látek jsou doloženy následujícími příklady, aniž by jimi byly jakkoliv omezeny.

## Příklady provedení

### Příklad 1

Příprava látky **1**. Směs 2-quinaxolidinmalondialdehydu (50 mg), 2-metyl-3-propyl benzothiazolu (180 mg) a suchého n-butanolu (7 ml) byla za míchání zahřívána na 110 °C po dobu 18 h. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs zfiltrována, pevný podíl promyt metanolem (3 ml) a sušen ve vakuu. Produkt byl získán ve formě zeleného kovově lesklého prášku. Výtěžek 136 mg, 81%.



Struktura látky 1

Charakterizace:  $^1\text{H-NMR}$ : 8,65 (1H, s); 8,49 (1H, d,  $J=14,1$  Hz); 8,32 (1H, d,  $J=14,1$  Hz); 8,24 – 7,99 (7H, m); 7,82 – 7,58 (6H, m); 7,46 (1H, t,  $J=7,3$  Hz); 4,82 (2H, s); 4,68 (2H, s); 2,05 (4H, m); 1,20 (6H, m).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 158,3; 149,0; 147,9; 141,2; 140,5; 139,1; 138,6; 129,1; 128,8; 128,5; 128,3; 128,2; 127,9; 127,8; 126,9; 126,5; 125,6; 124,9; 123,8; 123,2; 119,0; 115,3; 114,1; 106,4; 48,7; 47,3; 21,5; 20,4; 11,3; 10,8.

ES-MS vypočteno: 547; nalezeno: 545 ( $\text{M}^+ - 2\text{H}$ ); HRMS nalezeno: 545,1823.

Elementární analýza: vypočteno: C 58,75 %; H 4,63 %; nalezeno: C 59,12 %; H 4,87 %.

Absorbční maxima látky 1 v různých prostředích

Prostředí	$\lambda_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}}/100\,000$
dimetylsulfoxid	609	1,06
Methanol	608	1,34
Fosfátový pufr (pH 7,4)	493	0,33

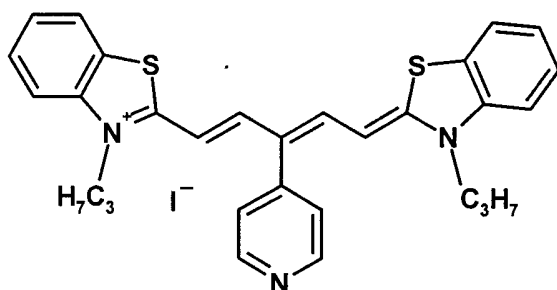
Emisní maxima látky 1 v různých prostředích

Prostředí	$\lambda_{\text{max}}$
dimetylsulfoxid	637
Methanol	630
Fosfátový pufr (pH 7,4)	627

Příklad 2

Příprava látky 2. Směs 2-(4-pyridyl)malondialdehydu (150 mg), 2-metyl-3-propyl benzothiazolu (640 mg) a suchého n-butanolu (10 ml) byla za míchání zahřívána na 110 °C

po dobu 18 h. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs přefiltrována, pevný podíl promyt metanolem (3 ml) a sušen ve vakuu. Produkt byl získán ve formě zeleného kovově lesklého prášku. Výtěžek 498 mg, 79%.



Struktura látky 2

Charakterizace:  $^1\text{H-NMR}$ : 8,94 (2H, d); 8,14–7,80 (8H, m); 7,58 (2H, t); 7,45 (2H, t); 6,20 (2H, d); 4,28 (4H, bs); 1,71 (4H, m); 0,85 (6H, t).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 156,9; 148,2; 143,6; 141,3; 128,2; 127,1; 125,5; 123,2; 114,0; 98,3; 47,5; 20,9; 10,8.

ES-MS vypočteno: 496,7, nalezeno: 496,3.

Elementární analýza: vypočteno: C 57,78 %; H 4,85 %; nalezeno: C 57,86 %; H 4,93 %.

Absorbční maxima látky 2 v různých prostředích

prostředí	$\lambda_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}/100\,000}$
dimetylsulfoxid	656	0,76
metanol	645	0,82
fosfátový pufr (pH 7,4)	641	0,46

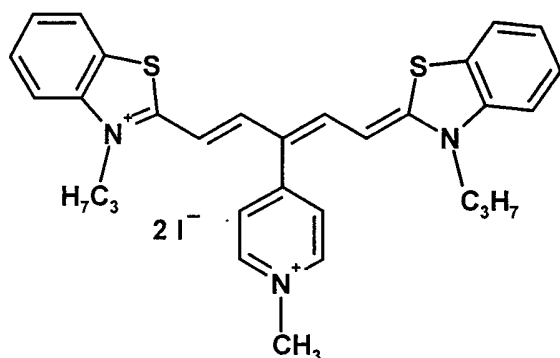
Emisní maxima látky 2 v různých prostředích

prostředí	$\lambda_{\text{max}}$
dimetylsulfoxid	665
metanol	662
fosfátový pufr (pH 7,4)	667

### Příklad 3

Příprava látky 3. Látka 2 (55 mg) byla rozpuštěna v dimethylformamidu (5 ml) a byl přidán nadbytek metyljodidu (2M roztok v t-BuOMe, 0,5 ml). Směs byla uzavřena v tlakové ampuli a zahřívána přes noc 60 °C. Druhý den byla reakční směs probublávána dusíkem, pro

odstranění přebytečného methyljodidu. Poté byla směs odpařena dosucha. Pevný podíl byl promyt dietyléterem a sušen ve vakuu. Produkt byl získán ve formě kovově lesklého prášku. Výtěžek 63 mg, 94%.



### Struktura látky 3

Charakterizace:  $^1\text{H-NMR}$ : 8,96 (2H, d); 7,98 – 8,16 (6H, m); 7,60 (2H, t); 7,48 (2H, t); 6,32 (2H, d); 4,35 (7H, bs); 1,72 (4H, sextet); 0,85 (6H, t).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 166,4; 153,4; 147,9; 145,3; 141,4; 128,3; 127,8; 125,7; 125,6; 123,3; 114,2; 98,6; 47,7; 47,1; 34,4; 21,1; 10,9.

ES-MS vypočteno: 255,8, nalezeno: 255,6 ( $M^{2+}/2$ ).

Elementární analýza: vypočteno: C 48,64 %; H 4,34 %; nalezeno: C 48,93 %; H 4,56 %.

Absorbční maxima látky 3 v různých prostředích

prostředí	$\lambda_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}/100\,000}$
dimetylsulfoxid	645	0,33
metanol	631	0,40
fosfátový pufr (pH 7,4)	628	0,42

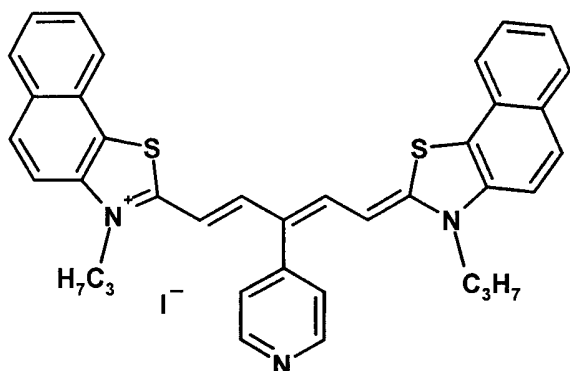
Emisní maxima látky 3 v různých prostředích

prostředí	$\lambda_{\text{max}}$
dimetylsulfoxid	666
metanol	650
fosfátový pufr (pH 7,4)	654

### Příklad 4

Příprava látky 4. Směs 2-(4-pyridyl)malondialdehydu (75 mg; 0,50mM), 2-methyl-3-propyl  $\alpha$ -naftothiazolium jodidu (373 mg; 10,1mM) a suchého n-butanolu (10 ml) byla za míchání zahřívána na 110 °C po dobu 18 h. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs

přefiltrována, pevný podíl promyt etanolem (3 × 5 ml) a sušen ve vakuu. Produkt byl získán ve formě zeleného kovově lesklého prášku. Výtěžek 302 mg, 83%.



Struktura látky 4

Charakterizace:  $^1\text{H-NMR}$ : 8,98 (2H, d,  $J=5,6$  Hz); 8,2-7,9 (12H, m); 7,80 (2H, t,  $J=7,3$  Hz); 7,67 (2H, t,  $J=7,5$  Hz); 6,36 (2H, d,  $J=11,6$  Hz); 4,45 (4H, t,  $J=6,5$  Hz); 1,78 (4H, sextet,  $J=7,2$ ); 0,94 (6H, t,  $J=7,3$  Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 165,6; 140,2; 130,8; 130,1; 129,8; 129,4; 127,5; 126,6; 123,5; 122,1; 113,8; 48,5; 21,9; 11,3.

HRMS vypočteno: 596,2189 ( $\text{M}^+$ ); nalezeno: 596,2184 ( $\text{M}^+$ )

Elementární analýza: vypočteno: C 63,06 %; H 4,74 %; nalezeno: C 63,11 %; H 4,80 %.

Absorbční maxima látky 4 v různých prostředích

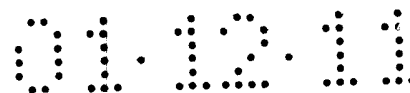
prostředí	$\lambda_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}/100\,000}$
dimetylsulfoxid	686	0,99
Methanol	676	1,10
fosfátový pufr (pH 7,4)	600	0,32

Emisní maxima látky 4 v různých prostředích

prostředí	$\lambda_{\text{max}}$
dimetylsulfoxid	707
Methanol	694
fosfátový pufr (pH 7,4)	699

**Využití polymethiniových solí jako buněčné sondy pro selektivní mitochondriální lokalizaci.**

Látky uvedené v tomto patentu vykazují selektivní lokalizaci v mitochondriích řady buněčných linií. Nově připravené, pozitivně nabitě, symetrické **polymethiniové soli** mají



vhodné spektroskopické vlastnosti: úzké excitační i emisní spektra, minimální fluorescenci ve vodném médiu, maximální fluorescenci při inkorporaci do lipofilního prostředí membrán mitochondrií. Tato barviva navíc vykazují výrazně vyšší fotostabilitu v porovnání s xantyliovými barvivy, komerčně používanými pro značení mitochondrií. Látky jsou navíc v mitochondriích zadržovány permanentně, což umožňuje jak výměnu média, tak fixaci a permeabilizaci buněk bez ztráty barvení.

Mitochondriální lokalizace námi připravených nových symetrických **polymethiniových solí** byla pozorována např. v buněčných liniích HeLa (odvozeny z karcinomu děložního čípku), LNCaP a PC-3 (buňky odvozeny z karcinomu prostaty), U2OS (buňky z osteosarkomu), MiaPaCa-2, BxPC-3, PaTu, CAPAN-2 (buňky odvozeny z adenokarcinomu pankreatu), HEK 293T (embryonální ledvinové buňky), HL-60 (buňky akutní myeloidní leukémie), KU-812 (buňky chronické myelogenní leukémie), myší buněčná linie 4T1 (buňky z karcinomu mléčné žlázy) a v primárních kuřecích embryonálních fibroblastech (CEF). Těmito příklady však není použití našich látek nijak omezeno. Tyto látky vykazují vysokou selektivitu pro mitochondrie, a to v odlišném principu než běžně používaná mitochondriální barviva jako například Mitotracker Green<sup>FM</sup>. Vysoká selektivita mitochondriální lokalizace byla pozorována při použití těchto látek, např. 1-4, a to v případě všech testovaných linií (viz Obrázek 1). V případě buněk U2OS byla účinnost lokalizace v mitochondriích dokonce značně vyšší než pro komerčně dostupný MitoTracker Green<sup>FM</sup>, jehož distribuce v mitochondriích byla slabá a neselektivní (Obrázek 2).

### **Příklad 1**

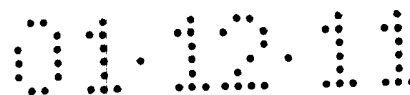
#### Příprava zásobního roztoku:

Vzhledem k nízké rozpustnosti našich sloučenin ve vodě byly sloučeniny rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (popř. dimethylformamid, metanol, etanol). Koncentrace zásobních roztoků, které byly uchovávány ve tmě při -20 °C, byla 5mM. Před použitím byly vzorky za nepřístupu světla ustáleny na laboratorní teplotu cca 23 °C a řádně promíchány.

### **Příklad 2**

#### Příprava buněk pro značení mitochondrií

Buňky linie HeLa (popř. U2OS, MiaPaCa-2, HEK 293T, 4T1) byly kultivovány v DMEM médiu (Dulbecco's Modified Eagle medium, Sigma USA), LNCaP v Iscove médiu (Sigma, USA), BxPC-3 (popř. HL-60, KU-812) v RPMI-1640 médiu (Sigma, USA), CAPAN-2 v McCoy médiu (Sigma, USA), PaTu v DMEM:F12 (1:1) médiu (Sigma, USA) doplněných



o 10% fetální bovinní sérum (FBS, Invitrogen, USA), 2mM Glutamax<sup>TM</sup> (Invitrogen, USA) a 1% směs vitamínů (MEM vitamins solution, Invitrogen, USA). Buňky byly udržovány v logaritmické fázi růstu a kultivovány za standardních podmínek (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% vlhkosti). Pro mikroskopické experimenty bylo inokulováno 100 000 buněk na kultivační misky se skleněným dnem (průměr 35 mm, MatTek, USA). Buňky byly inkubovány 16 ~~h~~<sup>h</sup> 24 h za standardních podmínek.

### **Příklad 3**

#### Barvení mitochondrií v živých buňkách

Buňky připraveny podle Příkladu 2 byly třikrát omyty fosfátovým pufrém (PBS; pH 7,4) a 10 min. inkubovány s 0–200 nM polymethiniovou solí rozpuštěnou v kompletním médiu. Pro dosažení co nejúčinnějšího barvení mitochondrií a minimálního nespecifického barvení byla typicky používána 20–50 nM koncentrace polymethiniových solí. Po barvení byly buňky 2x omyty fosfátovým pufrém a inkubovány v čerstvém kompletním médiu bez fenolové červeni.

### **Příklad 4**

#### Fixace mitochondrií

Mitochondrie značené našimi novými fluorescenčními sondami je možno pozorovat nejen za nativních podmínek, ale lze je také fixovat. Fixace je možná např. 8% roztokem glutaraldehydu ve fosfátovém pufru; pH 7,4 při pokojové teplotě po 20 min. anebo 4% roztokem paraformaldehydu ve fosfátovém pufru za stejných podmínek a mikroskopovány.

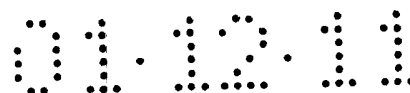
### **Příklad 5**

#### Kolokalizace dvou mitochondriálních barviv

Buňky připravené podle Příkladu 2 byly nejprve barveny roztokem polymethiniových solí 1, 2, 3 nebo 4 s 20–50nM koncentrací. Po barvení byly buňky 2x omyty fosfátovým pufrém a dobarvovány 120nM roztokem mitochondriální sondy MitoTracker Green<sup>FM</sup> (Molecular Probes) rozpuštěné v kompletním médiu, kultivace buněk probíhala za standardních podmínek (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% vlhkost) po dobu 10 min. Buňky byly 2x omyty fosfátovým pufrém a inkubovány s čerstvým kompletním médiem bez fenolové červeni a mikroskopovány (viz **Obrázek 1** a **Obrázek 3**).

### **Příklad 6**

#### Značení mitochondrií a jiných organel v buňce



Buňky připravené podle Příkladu 2 byly barveny 20-50nM roztokem polymethinových solí 1, 2, 3 nebo 4. Po barvení byly buňky 2x omyty fosfátovým pufrům a barveny po 20 min. 150nM roztokem sondy pro lysosomy LysoTracker Green (Molecular Probes) rozpuštěné v kompletním médiu za standardních kultivačních podmínek. Buňky byly 2x omyty fosfátovým pufrům a inkubovány 5 min. s roztokem jaderné sondy 4,6'-diamidino-2-fenylindolu (DAPI, 5 µg/ml) v kompletním médiu (viz **Obrázek 2**). Buňky byly 2x omyty fosfátovým pufrům a inkubovány v čerstvém kompletním médiu bez fenolové červeni. Barvení mitochondrií je možné kombinovat se značením dalších buněčných organel, jako je např. endoplazmatické retikulum anebo Golgiho komplex.

### Příklad 7

#### Mikroskopie

Buňky byly třikrát omyty fosfátovým pufrům a pozorovány pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Cell<sup>R</sup> (Olympus, Japonsko) za použití 60x (numerická apertura 1,4), popř. 100x imersního objektivu (Immersion oil 30cc, Olympus, Japonsko). V závislosti na spektroskopických vlastnostech testované látky byl použit filtr pro červený fluorescenční protein (RFP; ex. 535-555 nm / em. 570-625 nm, cut off 565 nm) anebo Cy5 filtr (ex. 590-650 nm / em. 663-738 nm, cut off 660 nm). Byla studována subbuněčná lokalizace polymethinových solí v živých buňkách jednotlivých buněčných linií v reálném čase anebo fixovaných preparátů.

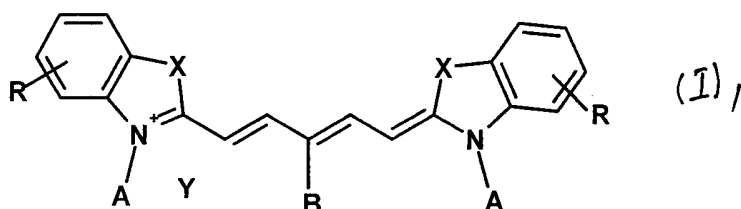
Mitochondriální značení našimi novými pozitivně nabitými symetrickými polymethiniovými solemi je možné kombinovat s barvením dalších studovaných proteinů pomocí fluorescenčně značených protilátek.

#### Průmyslová využitelnost

Polymethiniové soli jsou využitelné ve farmaceutickém průmyslu k přípravě mitochondriálních sond pro využití v medicíně.

## Patentové nároky

## 1. Využití polymethiniových solí obecného vzorce I,



kde obě koncové heteroaromatické skupiny methiniového řetězce jsou totožné a tvoří je heteroaromatické cykly odvozené od benzenu, jejichž konkrétní struktura je charakterizována skupinou A, B, X, Y a jednou nebo více skupinami R na obou koncích methiniové sole,

kde skupina A jsou alkyl C1 až C12- substituenty, glykolové řetězce s počtem glykolových (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) opakujících se jednotek 1 až 8 končící O-alkyl substituentem C1 až C12 nebo -OH skupinou, alkyl C1 až C8 sulfonové kyseliny nebo odpovídající jejich lithné nebo sodné, nebo draselné, nebo cesné, nebo rubidné sole, benzylová skupina, allylová skupina, 8-substituovaný kobalt bis(dikarbollid) a nebo cyklodextrinový kruh různé velikosti ( $\alpha - \gamma$ ),

kde skupina B je aromatický nebo heteroaromatický kruh, případně oligoaromatický nebo oligoheteroaromatický kruh, který může být dále substituován jedním či více stejnými nebo různými substituenty vybranými ze skupiny: fluor, chlor, brom, jod, hydroxy-, trifluormetyl, O-metyl, O-etyl, O-propyl, O-trimetylsilyl, thiol, S-metyl, S-etyl, S-propyl, amino, N-metyl, N-etyl, N-propyl, N-butyl, N-dimethyl, N-dietyl, N-dipropyl, N-dibutyl, N-bocyl, nitril, karboxyl, karboxymetyl, karboxyetyl, karboxypropyl, karboxybutyl, nitroso, azid, kyanát,

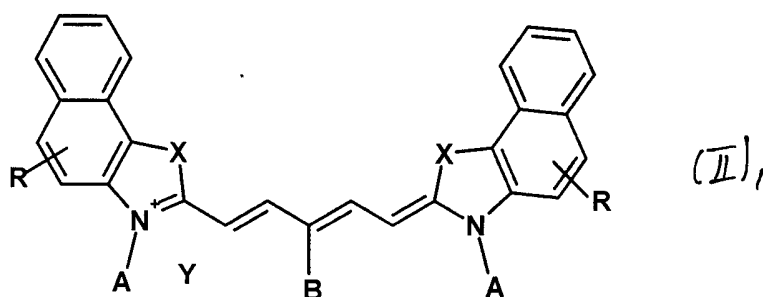
kde v případě dvojnásobně nabitých solí, skupinu B tvoří N-alkylamonium-heteroaromát, trialkylamoniový substituent nebo dialkylsulfoniový substituent přičemž kvarternizace na atomu dusíku nebo síry je provedena skupinou A,

kde skupina R je fluor, chlor, brom, jod, hydroxy, trifluormetyl, O-trimetylsilyl, thiol, S-metyl, S-etyl, S-propyl, amino, N-metyl, N-etyl, N-propyl, N-butyl, N-dimetyl, N-dietyl, N-dipropyl, N-dibutyl, N-bocyl, nitril, karboxyl, karboxymetyl, karboxetyl, karboxypropyl, karboxybutyl, nitroso, azid, kyanát, isokyanát, thiokyanát, isothiokyanát, N-alkyl, N-dialkyl substituent s C1 až C12 $\alpha$  řetězcem, alkyl C1 až C12 $\alpha$  substituent, O-alkyl C1 až C12 $\alpha$  substituent, glykolový řetězec s počtem glykolových jednotek 1 až 8 končící O-alkyl substituentem C1 až C12 $\alpha$  nebo -OH skupinou, 8-substituovaný kobalt bis(dikarbollid) a nebo cyklodextrinový kruh různé velikosti ( $\alpha - \gamma$ ),

kde X je dusík, kyslík, síra, selen nebo dimethyl methylenová skupina,

kde Y je chlorid, bromid, jodid, metylsulfonát, toluensulfonát, nebo nonafluorbutylsulfonát

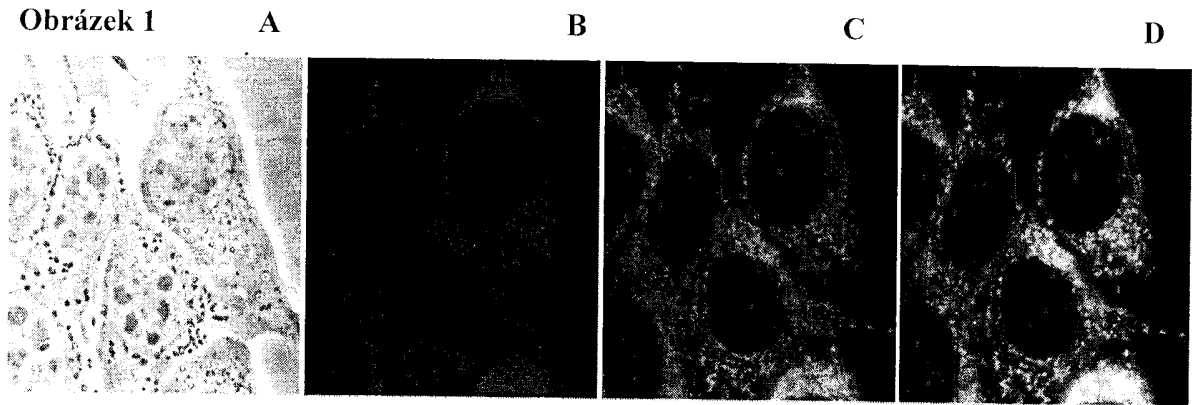
a obecného vzorce II,



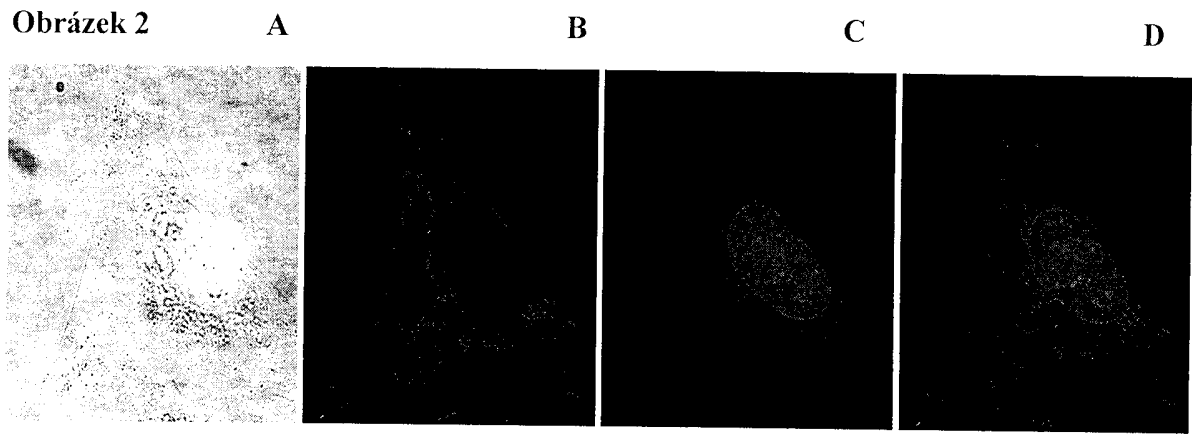
kde obě koncové heteroaromatické skupiny methiniového řetězce jsou totožné a tvoří je heteroaromatické cykly odvozené od naftalenu a kde B, R, X, Y, a A mají vpředu uvedený význam, pro přípravu selektivních buněčných sond pro značení mitochondrií, a to jak v živých i mrtvých buňkách.

2. Využití polymethiniových solí obecného vzorce I a II, podle nároku 1 pro přípravu sond pro značení izolovaných mitochondrií.

Obrázek 1



Obrázek 2



Obrázek 3

