

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKAÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2020-528
 (22) Přihlášeno: 22.09.2020
 (40) Zveřejněno: 30.03.2022
 (Věstník č. 13/2022)
 (47) Uděleno: 29.06.2022
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: 10.08.2022
 (Věstník č. 32/2022)

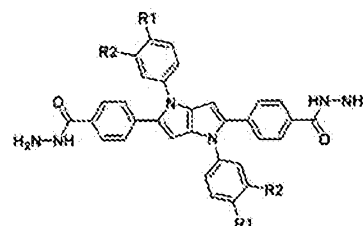
C07D 487/04 (2006.01)
 A61K 31/407 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 A61P 25/28 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
 JAKUBEK, Milan, et al. Hydrazones as novel epigenetic modulators: Correlation between TET 1 protein inhibition activity and their iron (II) binding ability. Bioorganic chemistry, 2019, 88: 102809. ISSN: 0045-2068; DOI: doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.034.
 CZ 2011681 A3; US 2011098309 A1.

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

(72) Původce:
 Veronika Antonyová, Msc., Žilina, SK
 Ameneh Tatar, Msc., Ph.D., Praha 6, Břevnov, CZ
 Ing. Robert Kaplánek, Ph.D., Praha 10, Hostivař, CZ
 Ing. Zdeněk Kejík, Ph.D., Sokolov, CZ
 Ing. Lucie Mikšátková, Chropyně, CZ
 prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Praha 4, Chodov, CZ
 RNDr. Barbora Dvořánková, Ph.D., Praha 3, Vinohrady, CZ
 RNDr. Pavol Szabo, Ph.D., Košice, SK
 Ing. Milan Jakubek, Ph.D., Rychvald, CZ

(74) Zástupce:
 Rott, Růžička & Guttman a spol., Vyskočilova
 1566, 140 00 Praha 4, Michle



(54) Název vynálezu:
Pyrrolo[3,2-b]pyrroly s benzhydrazidovou substitucí a jejich použití

(57) Anotace:
 Jsou popsány pyrrolo[3,2-b]pyrroly s benzhydrazidovou substitucí obecného vzorce I, kde R1, R2 jsou nezávisle H, OH, alkyl s 1 až 6 uhlíkovými atomy, C(CH₃)₃, allyl, benzyl, fenylyl, F, Cl, Br, I, CH₂OH, OCH₃, OCH₂CH₃, CF₃, OCF₃, CONH₂, CONHCH₃, CON(CH₃)₂, NO₂, N(CH₃)₂, N(CH₂CH₃)₂, NHCH₃, NHCOCH₃, nebo R1-R2 je -CH=CH-CH=CH-. Tyto sloučeniny mají cytostatické účinky a vykazují inhibiční aktivitu vůči TET1 proteinu a lze je použít pro přípravu terapeutických systémů k léčbě onkologických a neurodegenerativních poruch a onemocnění.

Pyrrolo[3,2-*b*]pyrroly s benzhydrazidovou substitucí a jejich použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká pyrrolo[3,2-*b*]pyrrolů s benzhydrazidovou substitucí a jejich použití jako terapeutik pro léčbu onkologických a neurodegenerativních poruch a onemocnění.

10 Dosavadní stav techniky

V posledních dvou dekáдах se ukázalo, že vznik a rozvoj závažných onemocnění je úzce spojen se změnami ve struktuře DNA, zejména se stupněm její methylace v poloze 5- na cytosinových bázích (5-methylcytosin, 5mC). Epigenetická regulace hladiny 5-methylcytosinu a stupně jeho oxidace či úplná demethylace má zásadní vliv na expresi genů. Oxidace 5-methylcytosinu (5mC) na 5-hydroxymethylcytosin (5hmC), následně na 5-formylcytosin (5fC), následně na 5-karboxylcytosin (5caC) je katalyzovaná Ten-eleven translokačními enzymy (TET methylcytosin dioxigenázy nebo též TET proteiny; TET1-3) [S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers, Y. Zhang: Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466 (2010) 1129-1133]. Dysregulace těchto procesů a abnormální změny v methylaci DNA vedou k řadě závažných patologických stavů. Regulace funkce TET proteinů, zejména jejich inhibice, tak má přímý vliv na methylaci DNA a její transkripci a tím i na vznik řady nemocí, zejména onkologických a neurodegenerativních onemocnění a poruch, např. akutní myeloidní leukémie, gliomy, kolorektální rakovina, rakovina prsu, melanomy, Rettův syndrom, Parkinsonova a Alzheimerova choroba [H. Cedar, Y. Bergman: Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 295–304; L. Tan, Y. G. Shi: Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development* 139 (2012) 1895-190; M. M. Suzuki, A. Bird: DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 465–476; K. D. Rasmussen, K. Helin: Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev.* 30 (2016) 733-750; R. B. Lorschach, J. Moore, S. Mathew, S. C. Raimondi, S. T. Mukatira, J. R. Downing: TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* 17 (2003) 637–641; A. P. Feinberg, R. Ohlsson, S. Henikoff: The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006) 21-33; J. Wang, G.M. Hong, A.G. Elkahloun, S. Arnovitz, J. Wang, K. Szulwach, L. Lin, C. Street, M. Wunderlich, M. Dawlaty, M.B. Neilly, R. Jaenisch, F.C. Yang, J.C. Mulloy, P. Jin, P.P. Liu, J.D. Rowley, M. Xu, C. He, J. Chen: TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013) 11994–11999; M. C. Haffner, A. Chaux, A. K. Meeker, D. M. Esopi, J. Gerber, L. G. Pellakuru, A. Toubaji, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, W. G. Nelson: Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* 2 (2011) 627–637; T.L. Cheng, J. Chen, H. Wan, B. Tang, W. Tian, L. Liao, Z. Qiu: Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. *Sci. Rep.* 7 (2017) 42790; E.M. Ellison, E.L. Abner, M.A. Lovell: Multiregional analysis of global 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine throughout the progression of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 140 (2017) 383–394; J. Zhao, Y. Zhu, J. Yang, L. Li, H. Wu, P.L. De Jager, P. Jin, D.A. Bennett: A genome-wide profiling of brain DNA hydroxymethylation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 13 (2017) 674–688].

TET1 protein (ten-eleven translokační methylcytosin dioxigenáza 1) je Fe(II)- a α -ketoglutarát-dependentní dioxigenáza katalyzující přeměnu 5-methylcytosinu (5mC) na 5-hydroxymethylcytosin (5hmC). TET1 protein se tak podílí na regulaci a řízení genové exprese [J. An, A. Rao, M. Ko: TET family dioxigenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. *Exp. Mol. Medicine* 49 (2017) e323; X. Wu, G. Li, R. Xie: Decoding the role of TET family dioxigenases in lineage specification. *Epigenetics Chromatin* 11 (2018) Art. No. 58]. Možnost

ovlivnění aktivity TET1 proteinu tak může být cestou k vývoji nových terapeutických systémů určených pro léčbu výše zmíněných onkologických a neurodegenerativních onemocnění. Tato strategie je prozatím limitována malým množstvím známých afektorů TET1 proteinu. Popsány byly, např. thioethery makrocyclických peptidů [K. Nishio, R. Belle, T. Katoh, A. Kawamura, T. Sengoku, K. Hanada, N. Ohsawa, M. Shirouzu, S. Yokoyama, H. Suga: Thioether Macrocyclic Peptides Selected against TET1 Compact Catalytic Domain Inhibit TET1 Catalytic Activity. *ChemBioChem* 19 (2018) 979-985] nebo deriváty cytosinu [G. N. L. Chua, K. L. Wassarman, H. Sun, J. A. Alp, E. I. Jarczyk, N. J. Kuzio, M. J. Bennett, B. G. Malachowsky, M. Kruse, Andrew J. Kennedy: *Cytosine-Based TET Enzyme Inhibitors*. *ACS Med. Chem. Lett.* 10 (2019) 180-185].

Jedním z typů sloučenin, které mohou ovlivňovat TET1 protein jsou látky schopné vázat ionty železa. V nedávné době bylo zjištěno, že deriváty hydrazinu dokáží ovlivňovat (inhibovat) TET1 protein a tato vlastnost je úzce spjata s jejich schopností vázat železnaté ionty [M. Jakubek, Z. Kejik, R. Kaplánek, V. Antonyová, R. Hromádka, V. Šandriková, D. Sýkora, P. Martásek, V. Král: *Hydrazones as novel epigenetic modulators: correlation between TET 1 protein inhibition activity and their iron(II) binding ability*. *Bioorg. Chem.* 88 (2019) 102809]. Deriváty hydrazinu, zejména hydrazidy a hydrazony, jsou známé svým širokým rozsahem biologické aktivity, zahrnující protirakovinné, antimikrobiální, antimykobakteriální, antivirální, fungicidní, antivirální, protimalarické účinky či mohou sloužit jako antialzheimerika či antiparkinsonika [B. Narasimhan, P. Kumar, D. Sharma: Biological activities of hydrazide derivatives in the new millennium. *Acta Pharm. Sci.* 2010, 52, 169-180; P. Kumar, B. Narasimhan: Hydrazides/Hydrazones as Antimicrobial and Anticancer Agents in the New Millennium. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2013, 13, 971-987; J.L. Buss, B. T. Greene, J. Turner, F. M. Torti, S. V. Torti: Iron Chelators in Cancer Chemotherapy *Curr. Top. Med. Chem.* 2004, 4, 1623-1635; S. Rollas, Ş. G. Küçüküzgel: Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules* 2007, 12, 1910-1939; P. Kumar, B. Narasimhan: Hydrazides/Hydrazones as Antimicrobial and Anticancer Agents in the New Millennium. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2013, 13, 971-987; R. León, A. G. Garcia, J. Marco-Contelles: Recent Advances in the Multitarget-Directed Ligands Approach for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Med. Res. Rev.* 2013, 33, 139-189; T. F. Tam, R. Leung-Toung, W. Li, Y. Wang, K. Karimian, M. Spinoet: Iron Chelator Research: Past, Present, and Future *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 983-995; A. Gaeta, R. C. Hider: The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Brit. J. Pharmacol.* 2005, 146, 1041-1059; G. Uppal, S. Bala, S. Kamboj, M. Saini: Therapeutic Review Exploring Antimicrobial Potential of Hydrazones as Promising Lead. *Pharma Chem.* 2011, 3, 250-268; R. Kaplánek, M. Havlík, J. Rak, J. Králová, V. Král: Deriváty Trögerovýchází a jejich cytostatické účinky. Patent CZ 305488 B6 (2015); R. Kaplánek, M. Jakubek, M. Havlík, J. Rak, T. Bříza, P. Džubák, M. Hajdúch, P. Konečný, J. Štěpánková, J. Králová, V. Král: Kofein-8-hydrazony jako nová cytostatika pro léčbu onkologických onemocnění (Caffeine-8-hydrazones as novel cytostatics for the treatment of oncologic diseases). Patent CZ 305625 B6 (2015); G. C. Look, L. Schultz, A. M. Polozov, N. Bhagat, J. Wang, D. E. Zembower, W. F. Goure, T. Pray, G. A. Krafft: Methods of inhibiting the formation of amyloid-beta diffusible ligands using acylhydrazide compounds. Patent US 2011098309 A1]. Deriváty hydrazinu také vykazují vazebné vlastnosti vůči iontům kovů [T. Hoy, J. Humphrys, A. Williams, P. Ponka, A. Jacobs: Effective iron chelation following oral administration of an isoniazid-pyridoxal hydrazone. *Brit. J. Haematol.* 1979, 43, 443-449; Z. Kejik, R. Kaplánek, M. Havlík, T. Bříza, D. Vavřínová, Bo. Dolenský, P. Martásek, V. Král: Aluminium(III) Sensing by Pyridoxal Hydrazone Utilizing the Chelation Enhanced Fluorescence Effect. *J. Lumin.* 180 (2016) 269-277; R. Kaplánek, M. Havlík, B. Dolenský, J. Rak, P. Džubák, P. Konečný, M. Hajdúch, J. Králová, V. Král: Synthesis and biological activity evaluation of hydrazone derivatives based on a Tröger's base skeleton. *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 1651-1659].

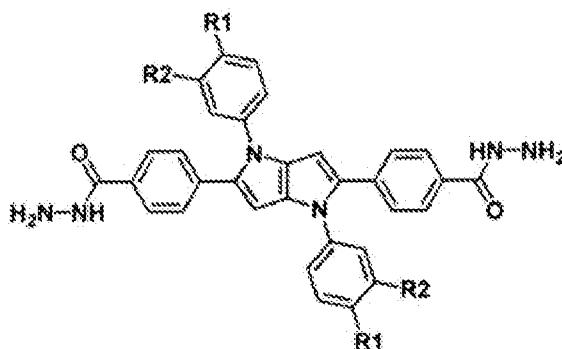
Pro sledování buněčné lokalizace aktivních látek musí být jejich molekuly označeny fluorescenční značkou; s výhodou jsou používány aktivní látky, které mají samy fluorescenční vlastnosti [M. S. T. Goncalves: Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chem. Rev.* 109 (2009) 190-212; Z. Guo, S. Park, J. Yoon, I. Shin: Recent progress in the development of near-infrared

fluorescent probes for bioimaging applications. Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 16-29; T. Bříza, J. Králová, S. Rimpelová, M. Havlík, R. Kaplánek, Z. Kejik, B. Reddy, K. Záruba, T. Ruml, I. Mikula, P. Martásek, V. Král: Dimethinium Heteroaromatic Salts as Building Blocks for Dual-Fluorescence Intracellular Probes. ChemPhotoChem 1 (2017) 442-450]. Vhodným fluorescenčním jádrem (próbu) jsou pyrrolo[3,2-*b*]pyrroly [M. Krzeszewski, B. Thorsted, J. Brewer, D. T. Gryko: Tetraaryl-, Pentaaryl-, and Hexaaryl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrroles: Synthesis and Optical Properties. J. Org. Chem. 79 (2014) 3119-3128; M. Krzeszewski, D. Gryko, D. T. Gryko: The Tetraarylpyrrolo[3,2-*b*]pyrroles-From Serendipitous Discovery to Promising Heterocyclic Optoelectronic Materials. Acc. Chem. Res. 50 (2017) 2334-2345; M. Tasior, B. Koszarna, D. C. Young, B. Bernard, D. Jacquemin, D. Gryko, D. T. Gryko: Fe(III)-Catalyzed synthesis of pyrrolo[3,2-*b*]pyrroles: formation of new dyes and photophysical studies. Org. Chem. Front. 6 (2019) 2939-2948].

Spojením bioaktivní benzhydrazidové skupiny, která je navíc schopna vázat ionty kovů, a fluorescenčního pyrrolo[3,2-*b*]pyrrolového jádra vzniknou hybridní molekuly s potenciálem ovlivňovat aktivitu TET1 proteinu, jejichž lokalizaci v buňce lze sledovat pomocí fluorescenční mikroskopie. Nové pyrrolo[3,2-*b*]pyrroly nesoucí benzhydrazidovou skupinu a jejich použití jako terapeutik pro léčbu onkologických a neurodegenerativních poruch a onemocnění jsou předmětem tohoto patentu.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou pyrrolo[3,2-*b*]pyrroly s benzhydrazidovou substitucí obecného vzorce I,



(I)

kde R1, R2 jsou nezávisle H, OH, alkyl s 1 až 6 uhlíkovými atomy, C(CH₃)₃, allyl, benzyl, fenylyl, F, Cl, Br, I, CH₂OH, OCH₃, OCH₂CH₃, CF₃, OCF₃, CONH₂, CONHCH₃, CON(CH₃)₂, NO₂, N(CH₃)₂, N(CH₂CH₃)₂, NHCH₃, NHCOCH₃, nebo

R1-R2 je -CH=CH-CH=CH-, tedy přikondenzované benzenové jádro,

Látky obecného vzorce I mají cytostatické účinky a vykazují inhibiční aktivitu vůči TET1 proteinu a lze je použít pro přípravu terapeutických systémů k léčbě onkologických a neurodegenerativních poruch a onemocnění.

Příprava pyrrolo[3,2-*b*]pyrrolů s benzhydrazidovou substitucí obecného vzorce I, jejich cytostatické vlastnosti, vazebné vlastnosti, lokalizace v buňkách a inhibiční vlastnosti vůči TET1 proteinu, jsou doloženy následujícími příklady, aniž by jimi byly jakkoliv omezeny.

Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje UV-Vis spektrum látky 2 v přítomnosti iontů Fe(II).

Obr. 2 znázorňuje titrační křivku pro látku 2 (10 μ M), ukazující závislost absorbance komplexu při maximu (390 nm) na koncentraci Fe(II) ve vodném médiu (voda/DMSO, 99:1).

Obr. 3 znázorňuje IC₅₀ látky 2 pro všechny testované linie.

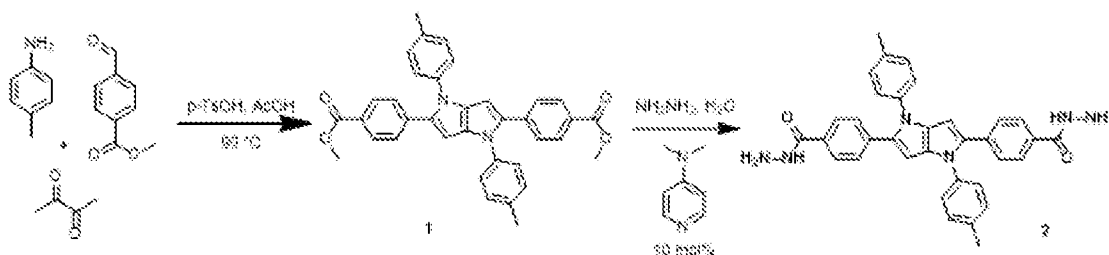
Obr. 4 znázorňuje intracelulární lokalizaci látky 2 (vlevo), komerčního barviva MitoTrackerRed (uprostřed) a překryv látky 2 a MitoTrackerRed (vpravo).

Obr. 5 znázorňuje závislost normalizované aktivity TET 1 (enzymatická aktivita v přítomnosti látky 2/aktivity neinhibovaného enzymu) na koncentraci látky 2.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Příprava 4,4'-(1,4-di-*p*-tolyl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzhydrazidu) (2), spadajícího pod obecný vzorec I.



Směs methyl 4-formylbenzoátu (1 g, 6,1 mmol), *p*-toluidinu (0,65 g, 6,1 mmol) a kyseliny *p*-toluensulfonové (110 mg, 0,6 mmol) v ledové kyselině octové (5 ml) byla míchána při 90 °C po dobu 30 min. Do husté žluté směsi byl přidán 2,3-butandion (260 μ l, 2,9 mmol) a reakční směs byla míchána při 90 °C po dobu 3 h. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla suspenze přefiltrována, žlutý filtrační koláč byl promyt ledovou kyselinou octovou a rekrystalizován ze směsi dichlormethan-hexan (1:1, v/v). Bylo získáno 510 mg (15 %) dimethyl 4,4'-(1,4-di-*p*-tolyl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)dibenzoátu (intermediát 1).

¹H NMR (CDCl₃): 7,75 (d, *J* = 7,7 Hz, 4H), 7,15 (d, *J* = 8,0 Hz, 4H), 7,10 – 7,01 (m, 8H), 6,35 (s, 2H), 3,77 (s, 6H), 2,27 (s, 6H).

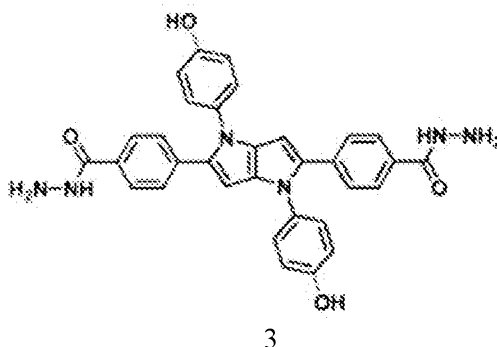
Směs diesteru 1 (500 mg, 0,9 mmol) a katalytického množství 4-(dimethylamino)pyridinu (11 mg, 0,09 mmol) v hydrazin hydrátu (9 ml; 180 mmol) byla míchána při 115 °C po dobu 2 dnů. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl pevný produkt odfiltrován a promyt ledovým dichlormethanem. Surový produkt byl rekrystalizován z dichlormethanu, bylo získáno 300 mg (60%) 4,4'-(1,4-di-*p*-tolyl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzhydrazidu) (látky 2) ve formě žluté pevné látky.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): 9,70 (s, 2H), 7,98-7,51 (m, 4H), 7,49-6,91 (m, 12 H), 6,55 (s, 2H), 4,57 (s, 4H), 2,35 (s, 6H).

Přípravu je možné provést i tak, že surový intermediát po filtraci a promytí kyselinou octovou je přímo použit do dalšího reakčního kroku, není tedy čištěn krystalizací. Krystalizuje se až finální produkt (látko 2). Celkový výtěžek látky 2 připravené tímto způsobem je srovnatelný s prvním postupem.

Příklad 2

Příprava 4,4'-(1,4-bis(4-hydroxyfenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazidu) (3), spadajícího pod obecný vzorec I.

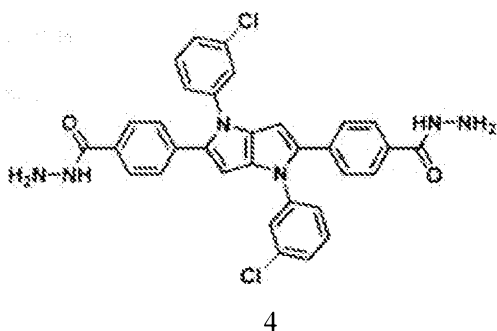


Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit 4-aminofenol (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci ze směsi chloroform-methanol byl získán 4,4'-(1,4-bis(4-hydroxyfenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazid) (3) v celkovém výtěžku 9,0 % (vzhledem k 2,3-butandionu).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): 9,77 (s, 2H), 8,92 (bs, 2H), 8,10-6,90 (m, 16 H), 6,54 (s, 2H), 4,57 (s, 4H).

Příklad 3

Příprava 4,4'-(1,4-bis(3-chlorfenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazidu) (4), spadajícího pod obecný vzorec I.

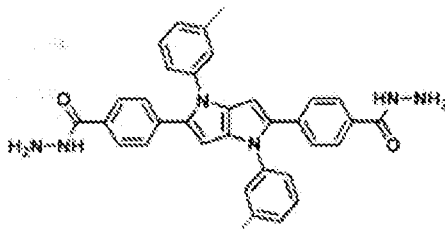


Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit 3-chloranilin (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci z chloroformu byl získán 4,4'-(1,4-bis(3-chlorfenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazid) (4) v celkovém výtěžku 8,2 % (vzhledem k 2,3-butandionu).

^1H NMR (DMSO- d_6): 9,66 (s, 2H), 8,00-7,50 (m, 4H), 7,40-7,05 (m, 12 H), 6,60 (s, 2H), 4,52 (s, 4H).

Příklad 4

Příprava 4,4'-(1,4-bis(3-tolyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazidu) (5), spadajícího pod obecný vzorec I.



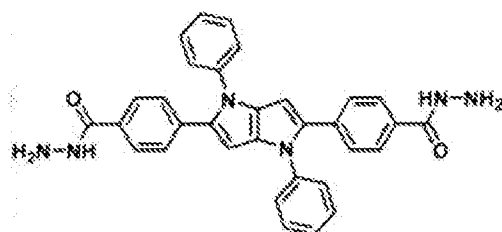
5

Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit 3-methylanilin (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci z chloroformu byl získán 4,4'-(1,4-bis(3-tolyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazid) (5) v celkovém výtěžku 9,1 % (vzhledem k 2,3-butandionu).

^1H NMR (DMSO- d_6): 9,74 (s, 2H), 8,00-7,50 (m, 4H), 7,50-6,88 (m, 12 H), 6,53 (s, 2H), 4,60 (s, 4H), 2,38 (s, 6H).

Příklad 5

Příprava 4,4'-(1,4-difenyl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazidu) (6), spadajícího pod obecný vzorec I.



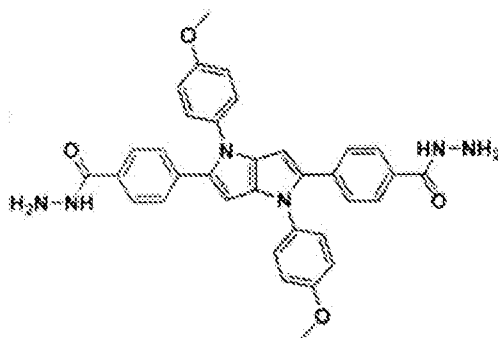
6

Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit anilin (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci z chloroformu byl získán 4,4'-(1,4-difenyl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazid) (6) v celkovém výtěžku 7,7 % (vzhledem k 2,3-butandionu).

^1H NMR (DMSO- d_6): 9,80 (s, 2H), 8,00-6,80 (m, 18H), 6,50 (s, 2H), 4,61 (s, 4H).

Příklad 6

Příprava 4,4'-(1,4-bis(4-methoxyfenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazidu) (7), spadajícího pod obecný vzorec I.



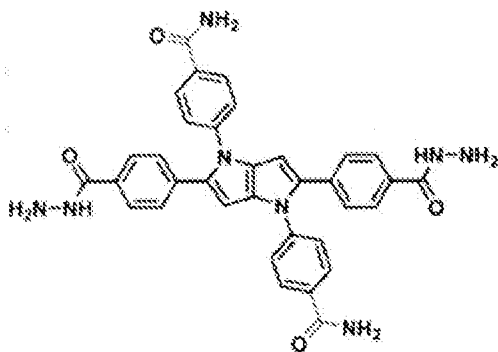
7

Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit 4-methoxyanilin (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci z dichlormethanu byl získán 4,4'-(1,4-bis(4-methoxyfenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazid) (7) v celkovém výtěžku 9,4 % (vzhledem k 2,3-butandionu).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): 9,70 (s, 2H), 8,05-6,88 (m, 16 H), 6,53 (s, 2H), 4,58 (s, 4H), 3,81 (s, 6H).

Příklad 7

Příprava 4,4'-(2,5-bis(4-(hydrazinkarbonyl)fenyl)pyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-1,4-diyl)dibenzamidu (8), spadajícího pod obecný vzorec I.



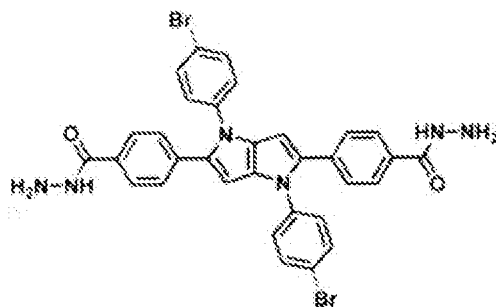
8

Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit 4-aminobenzamid (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci ze směsi dichlormethan-methanol byl získán 4,4'-(2,5-bis(4-(hydrazinkarbonyl)fenyl)pyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-1,4-diyl)dibenzamid (8) v celkovém výtěžku 6,9 % (vzhledem k 2,3-butandionu).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): 8,10-6,81 (m, 16 H), 6,56 (s, 2H), 4,62 (bs, 4H).

Příklad 8

Příprava 4,4'-(1,4-bis(4-bromfenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazidu) (9), spadajícího pod obecný vzorec I.



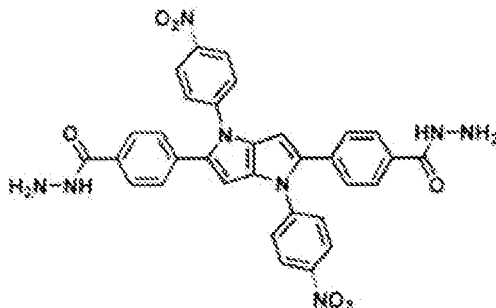
9

- 5 Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit 4-bromanilin (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci z chloroformu byl získán 4,4'-(1,4-bis(4-bromofenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazid) (9) v celkovém výtěžku 10,5 %
10 (vzhledem k 2,3-butandionu).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): 9,87 (s, 2H), 8,05-7,52 (m, 4H), 7,47-6,90 (m, 12 H), 6,50 (s, 2H), 4,57 (s, 4H).

15 Příklad 9

Příprava 4,4'-(1,4-bis(4-nitrofenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazidu) (10), spadajícího pod obecný vzorec I.



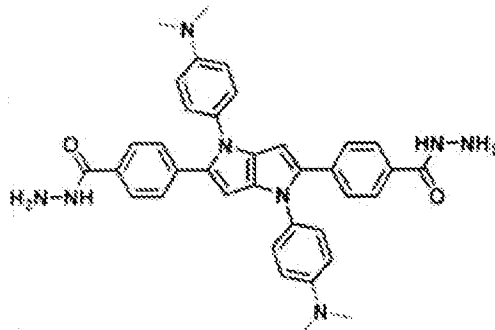
10

- 20 Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit 4-nitroanilin (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci z chloroformu byl získán 4,4'-(1,4-bis(4-nitrofenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazid) (10) v celkovém výtěžku 6,5% (vzhledem
25 k 2,3-butandionu).

- 30 ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 9,85 (s, 2H), 8,05-7,52 (m, 4H), 7,47-6,90 (m, 12 H), 6,47 (s, 2H), 4,60 (s, 4H).

Příklad 10

- 5 Příprava 4,4'-(1,4-bis(4-dimethylaminofenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazidu) (11), spadajícího pod obecný vzorec I.



11

- 10 Látka byla připravena podle postupu uvedeného v příkladu 1 s tím rozdílem, že v prvním kroku byl místo *p*-toluidinu použit 4-dimethylaminoanilin (6,1 mmol). Odfiltrovaný surový meziprodukt (intermediát) byl použit přímo do dalšího reakčního kroku. Ten byl proveden podle postupu uvedeného v příkladu 1; po rekrystalizaci z dichlormethanu byl získán 4,4'-(1,4-bis(4-dimethylaminofenyl)-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzohydrazid) (11)
15 v celkovém výtěžku 7,3 % (vzhledem k 2,3-butandionu).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): 9,80 (s, 2H), 8,05-6,90 (m, 16 H), 6,53 (s, 2H), 4,58 (s, 4H), 2,88 (s, 12H).

Příklad 11

- 20 Vazebné vlastnosti pyrrolo[3,2-*b*]pyrrolů s benzhydrazidovou substitucí vůči Fe²⁺ iontům.

- Absorpční spektrum 4,4'-(1,4-di-*p*-tolyl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzhydrazidu), spadajícího pod obecný vzorec I (látky 2) bylo změřeno spektrometrem Cintra 404 GBC. Komplexace látky 2 s ionty železa (Fe²⁺) byla studována UV-Vis spektroskopií
25 ve vodném médiu (voda/DMSO, 99: 1). Vazebná konstanta (K_s) byla vypočtena ze změn absorbance AA látky 2 při spektrálním maximu komplexu se železem (Fe²⁺) (391 nm) nelineární regresní analýzou pomocí softwaru Letagrop Spefo 2005. Koncentrace látky 2 byla 10 μM. Koncentrace iontů železa (Fe²⁺) byla v rozmezí od 0 mM do 0,5 mM. Rozsah UV-Vis spektra byl
30 300 až 600 nm, s 1 nm rozestupy dat při skenovací rychlosti 300 nm/min. Roztoky byly smíchány v kyvetě během celé titrace a po každém přidání železa.

- Byla prokázána schopnost testované látky (2) chelatovat ionty železa (Fe²⁺). Vazebná konstanta pro komplex 1:1 (Fe²⁺: látka 2) byla Log(K) = 19,4 a pro komplex 1:2 byla Log(K) = 8,9.
35 Obrázek 1 znázorňuje UV-Vis spektrum látky 2 v přítomnosti iontů Fe(II).

Obrázek 2 znázorňuje titrační křivku pro látku 2 (10 μM), ukazující závislost absorbance komplexu při maximu (390 nm) na koncentraci Fe(II) ve vodném médiu (voda/DMSO, 99:1)

Příklad 12

Cytotoxicita pyrrolo[3,2-*b*]pyrrolů s benzhydrazidovou substitucí.

- Stanovení IC₅₀: Životaschopnost buněk byla měřena kolorimetrickým testem MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid]. Buňky HF-P4 a A-2058 byly kultivovány v
45

96-jamkových destičkách v hustotě $1,0 \times 10^5$ buněk/jamka a ponechány růst po dobu 24 hodin ve 200 μ l Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) obsahujícího streptomycin a 10% fetální hovězí sérum [FBS] při 37 °C a 5% CO₂. Buňky U2-OS byly kultivovány v 96-jamkových destičkách v hustotě $1,0 \times 10^5$ buněk/jamka a ponechány růst po dobu 24 hodin ve 200 μ l McCoy's médiu obsahujícího streptomycin a 10% fetální hovězí sérum [FBS] při 37 °C a 5% CO₂. Po inkubaci byl k buňkám z každé jamky přidán chelátor AT-751 v koncentračním rozmezí od 100 nM do 100 μ M (100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M a 100 μ M). Každá koncentrace byla měřena čtyřikrát v rámci jednoho testu a celý test byl opakován třikrát. Chelátory byly zředěny v DMSO a DMEM na konečný objem 200 μ l. Po 48 hodinách expozice byly roztoky chelátoru odsáté a k buňkám bylo přidáno 175 μ l MTT roztoku. Proběhla inkubace po dobu 2 hodin. Po inkubaci bylo přidáno 125 μ l DMSO k rozpuštění tmavých krystalů formazanu vytvořených v intaktních buňkách a absorbance byla měřena při 570 nm pomocí Tegan MicroPlate readeru.

Účinek testovaného chelátoru AT-751 na zdravé lidské fibroblasty HF-P4, lidské maligní melanomové buňky A-2058 a buňky lidského osteosarkomu U2-OS byl hodnocen pomocí testu MTT. Rozmezí koncentrací chelátoru bylo 0,1 až 100 μ mol/l.

Látka 2 vykazovala cytotoxický efekt jak vůči zdravým lidským fibroblastům HF-P4 (IC_{50} = 23,34 μ M), tak vůči lidským maligním melanomovým buňkám A-2058 (IC_{50} = 25,59 μ M) a buňkám lidského osteosarkomu U2-OS (IC_{50} = 1,34 μ M).

Obr. 3 znázorňuje IC_{50} látky 2 pro všechny testované linie.

Příklad 13

Intracelulární lokalizace pyrrolo[3,2-*b*]pyrrolů s benzhydrazidovou substitucí.

Intracelulární lokalizace 4,4'-(1,4-di-*p*-tolyl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzhydrazidu), spadajícího pod obecný vzorec I (látky 2), byla zkoumána fluorescenční mikroskopií živých buněk v reálném čase pomocí mikroskopu Leica TCS SP8 WLL SMD-FLIM ve 37 °C a 5% CO₂ atmosféře. Buňky HF-P4 v hustotě $4,0 \times 10^4$ buněk/sklíčko byly naočkovány na 22 x 22 mm sklíčka pro zobrazení živých buněk v kompletním kultivačním médiu buněk (DMEM se streptomycinem a 10% FBS). Buňky byly ponechány přes noc (24 hodin) pro adhezi. Po 1-denní inkubaci bylo médium odsáto a buňky byly inkubovány po dobu 15 minut (37 °C, 5% CO₂) v DMEM obsahujícím látku 2 v koncentraci 1 μ mol/l. Jako standardy pro hodnocení přesné intracelulární lokalizace byly použity MitoTracker® Red FM v koncentraci 50 nmol/l (MTR) a LysoTracker® Green FM při koncentraci 300 nmol/l (LTG). Po inkubační době byly buňky dvakrát propláchnuty PBS a ponechány v čerstvém médiu bez fenolové červeně. Pro vizualizaci buněk jsme použili vodní objektiv HC PL APO CS2 63x (NA 1.2) a laser s excitační vlnovou délkou 405 nm (výkon 10%) s fluorescenčním emisním rozsahem 415 až 470 nm. Pro MitoTracker® Red jsme použili laser s excitační vlnovou délkou 579 nm (výkon 8 %) a pro LysoTracker® Green jsme použili laser s excitační vlnovou délkou 504 nm (výkon 10 %). Dále jsme stanovili kolokalizaci testované látky s mitochondriemi a lysosomy korelační statistickou analýzou hodnot intenzity červených (MitoTracker) a modrých (látky 2) nebo zelených (LysoTracker) a modrých (látky 2) pixelů ve dvoukanálových obrazech. Pomocí softwaru ImageJ jsme určili Pearsonovy korelační koeficienty.

Pomocí fluorescenční mikroskopie živých buněk v reálném čase na linii lidských fibroblastů HF-P4 jsme s využitím organelově specifické fluorescenční značky (MTR, LTG) zjistili mitochondriální lokalizaci látky 2. Pearsonův korelační koeficient pro kolokalizaci látky 2, a MTR ukázal velmi pozitivní lineární vztah, čímž potvrdil lokalizaci látky 2 v mitochondriích. Hodnota Pearsnova korelačního koeficientu byla 0,92.

Obrázek 4 znázorňuje intracelulární lokalizaci látky 2 (vlevo), komerčního barviva MitoTrackerRed (uprostřed) a překryv látky 2 a MitoTrackerRed (vpravo).

Příklad 14

Inhibiční aktivita pyrrolo[3,2-*b*]pyrrolů s benzhydrazidovou substitucí vůči TET1 proteinu.

5

Pomocí fluorimetrického kitu pro stanovení aktivity TET hydroxylázy (TET1 proteinu) jsme testovali 4,4'-(1,4-di-*p*-tolyl-1,4-dihydropyrrolo[3,2-*b*]pyrrol-2,5-diyl)di(benzhydrazid), spadající pod obecný vzorec I (látky 2). Byl použitý purifikovaný TET 1 enzym. Inhibiční aktivita látky 2 byla měřena podle protokolu výrobce. TET 1 se váže na methylovaný substrát a převádí jej na hydroxymethylované produkty, které můžou být rozpoznávány specifickou protilátkou. Množství těchto produktů jsme stanovili měřením intenzity fluorescence na MicroPlate čtečce při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 590 nm.

10

V experimentu jsme pozorovali inhibiční účinek pro TET 1 pro látku 2. Hodnota IC₅₀ pro látku 2 byla 0,87 μM.

15

Obr. 5 znázorňuje závislost normalizované aktivity TET 1 (enzymatická aktivita v přítomnosti látky 2/aktivita neinhibovaného enzymu) na koncentraci látky 2.

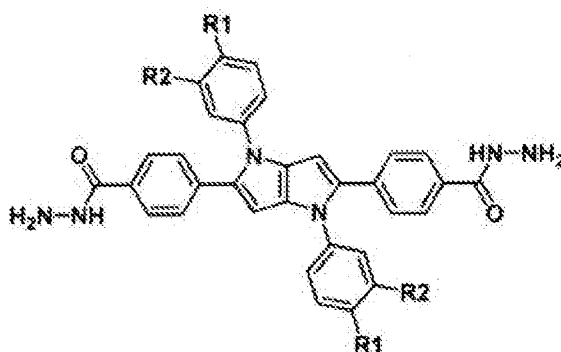
20

Průmyslová využitelnost

Vynález je využitelný ve farmaceutickém průmyslu, k přípravě nových léčiv a k léčbě onkologických a neurodegenerativních poruch a onemocnění.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Pyrrolo[3,2-*b*]pyrroly s benzhydrazidovou substitucí obecného vzorce I,



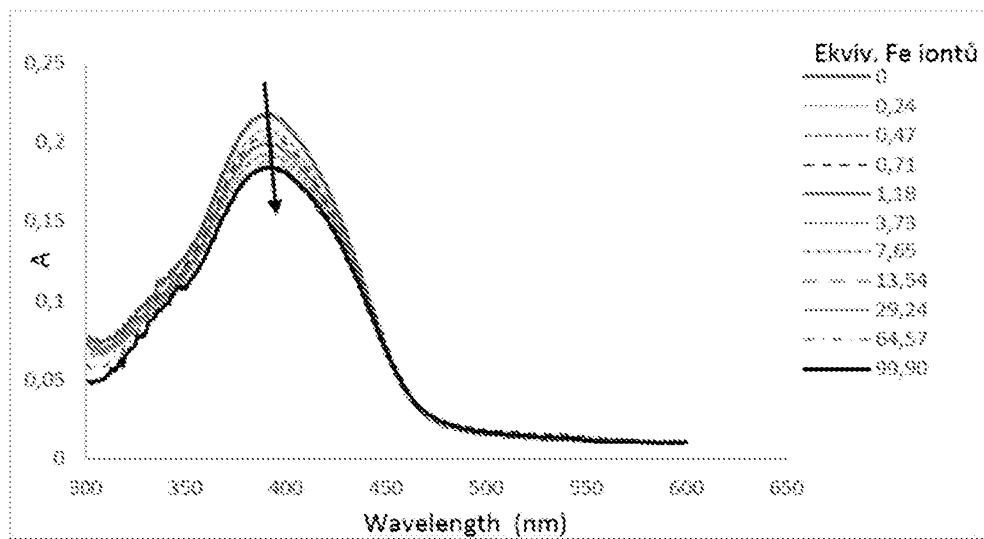
(I)

kde R1, R2 jsou nezávisle H, OH, alkyl s 1 až 6 uhlíkovými atomy, C(CH₃)₃, allyl, benzyl, fenyl, F, Cl, Br, I, CH₂OH, OCH₃, OCH₂CH₃, CF₃, OCF₃, CONH₂, CONHCH₃, CON(CH₃)₂, NO₂, N(CH₃)₂, N(CH₂CH₃)₂, NHCH₃, NHCOCH₃, nebo R1-R2 je -CH=CH-CH=CH-, tedy přikondenzované benzenové jádro.

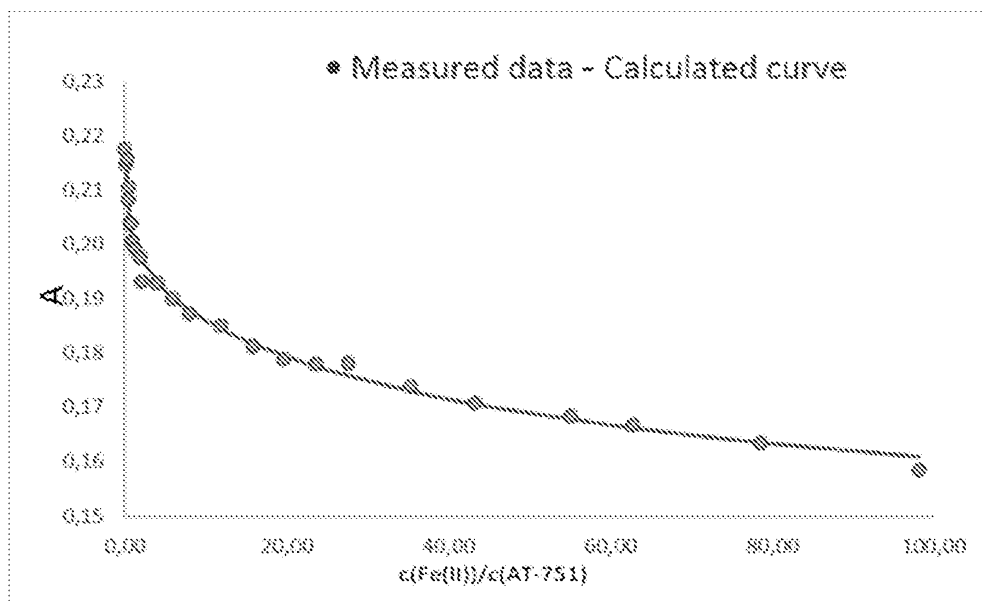
2. Použití látek obecného vzorce I podle nároku 1, pro přípravu léčiva k léčbě onkologických onemocnění.

3. Použití látek obecného vzorce I podle nároku 1, pro přípravu léčiva k léčbě neurodegenerativních poruch a onemocnění.

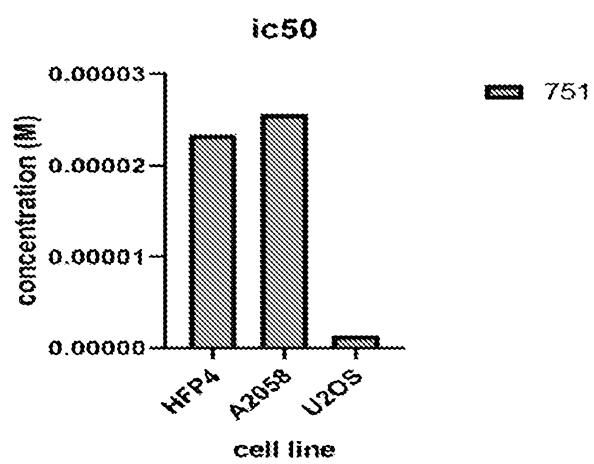
3 výkresy



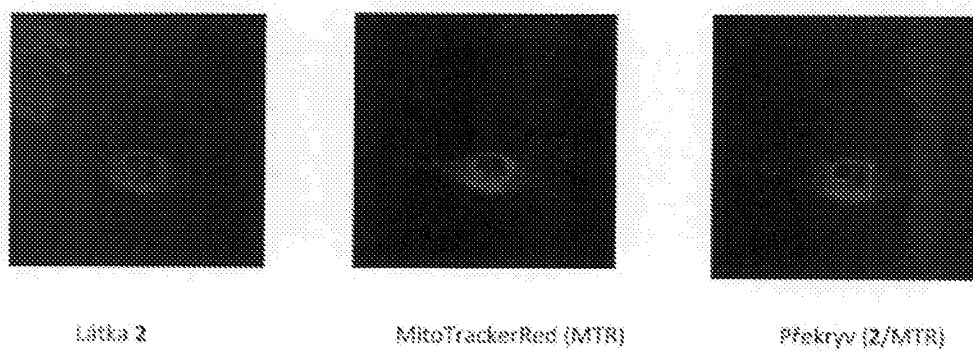
Obr. 1



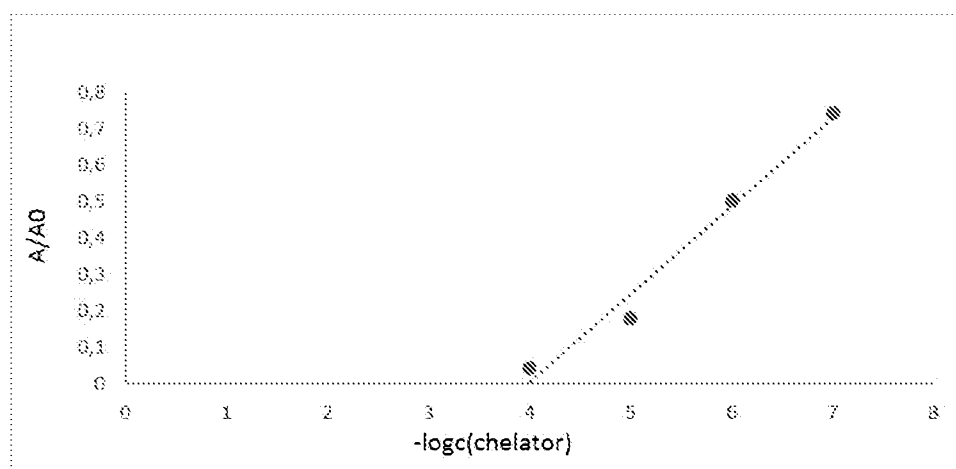
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5