

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 163

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 455/03 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 521/00 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 31/473 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-369**
 (22) Přihlášeno: **29.05.2014**
 (40) Zveřejněno: **09.12.2015**
(Věstník č. 49/2015)
 (47) Uděleno: **03.01.2018**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **14.02.2018**
(Věstník č. 7/2018)

(56) Relevantní dokumenty:

CZ 2013-32; CZ 2009-237.

(73) Majitel patentu:
 Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
 Praha 6, CZ
 Vysoká škola chemicko - technologická v Praze,
 Praha 6, CZ

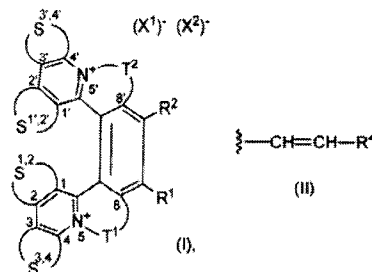
(72) Původce:
 Mgr. Filip Teplý, Ph.D., Roztoky u Prahy, CZ
 Mgr. Miroslav Hájek, Ph.D., Praha 8, CZ
 RNDr. Erika Kužmová, Ph.D., Bratislava, SK
 Jaroslav Kozák, Holešov, CZ
 Bc. Veronika Komárková, Zbiroh, CZ
 Bc. Pavla Hubálková, Verměřovice, CZ
 Paul Eduardo Reyes - Gutiérrez, Ph.D., San Luis
 Potosí, MX
 Bc. Michael Jirásek, Český Brod, CZ
 Mgr. Monoj R. Sonawane, Dhule, IN
 Mgr. Vishwas D. Joshi, Nanded, IN
 Ing. Lukáš Severa, Votice, CZ
 Ing. Jana Novotná, Kolín 3, CZ

(74) Zástupce:
 RNDr. Ladislava Součková, CSc., Flemingovo
 nám. 2, 166 10 Praha 6

(54) Název vynálezu:
**Helquaty s heteroaromatickými
 substituenty, jejich příprava a použití jako
 stabilizátory G-kvadruplexů**

(57) Anotace:
 Helquaty obecného vzorce I, kde substituenty R^1 a R^2 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny, zahrnující H a C_1 a C_4 alkyl, nejvýše tři páry sousedících atomů v polohách 1 a 2, 3 a 4, 1' a 2', 3' a 4' jsou případně přemostěny spojkou S a zároveň jeden až čtyři atomy se sudým deskriptorem (tj. 2, 4, 2', 4') jsou substituovány substituentem R^3 obecného vzorce II, přičemž R^4 je

substituovaný, či nesubstituovaný heteroaryl. $S^{1,2}$, $S^{1',2'}$, $S^{3,4}$ a $S^{3',4'}$ je spojka tvořená uhlovdíkovým řetězcem o 3 až 6 atomech uhlíku, s výhodou uhlovdíkovým řetězcem o 4 atomech uhlíku, přičemž struktura jednotlivých spojek S je vzájemně nezávislá, a T^1 a T^2 jsou spojky, které přemostí ují atomy N^5 s C^8 a $N^{5'}$ s $C^{8'}$, kde uvedená spojka je tvořena uhlovdíkovým řetězcem o 2 až 5 atomech uhlíku, s výhodou o 2 nebo 3 atomech uhlíku, přičemž struktura jednotlivých spojek T je vzájemně nezávislá, a anionty (X^1) a (X^2) jsou na sobě nezávislé anionty solí a výhodně farmaceuticky přijatelných solí. Použití jako léčiv k léčbě chorob, souvisejících se zvýšenou proliferací buněk, jako jsou nádorová onemocnění a k léčbě, vyžadující ovlivnění G-kvadruplexu, s výhodou v telomerách nebo v promotorech genů.



CZ 307163 B6

Helquaty s heteroaromatickými substituenty, jejich příprava a použití jako stabilizátory G–kvadruplexů

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových helquatů s heteroaromatickými substituenty, způsobu jejich přípravy, jejich využití jako léčiv k léčbě onemocnění souvisejících se zvýšenou proliferací buněk a pro stabilizaci G–kvadruplexů.

10

Dosavadní stav techniky

15 Originální látky využitelné v terapii rakoviny jsou předmětem zájmu průmyslu i akademických laboratoří [Avendano, C, Menendez, J. C. (2008) *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier Science, 1. vydání].

Zhoubná nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí [Siegel R. a spol. (2012), *CA Cancer J. Clin.* 62, 10–29]. Jedná se o nekontrolovaný buněčný růst, jehož vznik bývá podmíněn jak negativními vnějšími vlivy během života, tak genetickou výbavou. Pro vznik a vývoj nádorového onemocnění je potřeba akumulace několika různých genetických nebo epigenetických změn vedoucích k transformaci zdravé buňky v plně maligní fenotyp [Stratton M. R. (2011), *Science* 331, 1553–1558]. Jedná se především o mutace v genech kódujících proteiny, které se podílejí na regulaci dělení a diferenciaci buněk, replikaci a opravách DNA, na regulaci apoptózy poškozených buněk, na mezibuněčné komunikaci a přenosu signálů uvnitř buňky [Hanahan D., Weinberg R. A. (2000), *Cell* 100, 57–70]. Maligní (zhoubné) buňky mají na rozdíl od benigních schopnost prorůst do okolní normální tkáně (invazivita) a také schopnost uvolňovat shluky buněk primárního nádoru, které cestují krevním nebo lymfatickým řečištěm do vzdálených míst, kde se usazují a zakládají nová nádorová ohniska (proces metastázování) [Nguyen D. X. a spol. (2009), *Nat. Rev. Cancer* 9, 274–284].

30

Cílem protinádorové terapie je selektivně indukovat apoptózu u nežádoucích nádorových buněk, bez současného poškození okolní zdravé tkáně. Cytotoxické léky působí tak, že poškozují DNA nebo mikrotubuly a jejich specifická vůči nádorovým buňkám v lidském těle spočívá v jejich schopnosti přednostně zabít rychle proliferující buňky. Tato selektivita může být doložena jejich cytostatickými účinky v buněčné kultuře *in vitro* [Chabner B. A., Roberts T. G (2005), *Nat. Rev. Cancer* 5, 65–72; Lüllmann H. a spol. (2005), *Farmakologie a toxikologie*, Grada, 15. Vydání].

35

40 Limitujícím faktorem pro docílení co nejvyšší selektivity cytotoxického účinku je však skutečnost, že nádorové buňky jsou odvozeny od buněk vlastního organismu. Citlivost nádorových buněk vůči cytostatiku je pak dána růstovou frakcí nádoru (poměrem proliferujících a neproliferujících buněk nádoru), pozicí buňky v rámci buněčného cyklu a přirozenou a získanou rezistencí nádorových buněk vůči cytostatiku.

45

G–kvadruplexy jsou považovány za atraktivní molekulární cíle protinádorové terapie budoucnosti [Neidle S. (2011), *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, Academic Press, 1. vydání]. Ovlivnění stability DNA G–kvadruplexů bylo identifikováno jako jeden z mechanismů regulace klíčových procesů na buněčné úrovni. Originální látky využitelné pro ovlivnění stability G–kvadruplexů jsou tedy předmětem zájmu průmyslu i mnoha akademických laboratoří. Důležitým stimulem pro hledání terapeuticky využitelných stabilizátorů těchto DNA struktur jsou nedávno zveřejněné důkazy jejich existence na buněčné úrovni [Biffi G. a spol. (2013), *Nature Chemistry*, 5, 182–186; Biffi G. a spol. (2014), *Nature Chemistry*, 6, 75] i významného zastoupení sekvencí tvořících G–kvadruplexy v lidském genomu [Yi E. a spol. (2013), *Nature Communications*, 4, 1796].

55

Četný výskyt G–kvadruplexů byl zaznamenán v promotorových oblastech genů, přičemž jejich fyzikálně–chemické a strukturní charakteristiky z nich činí zajímavé terapeutické cíle. Represe transkripce onkogenů v důsledku stabilizace těchto čtyřvláknových DNA struktur v promotorových oblastech genů malými molekulami je tak jednou ze sledovaných strategií protinádorové terapie [Balasubramanian S. a spol. (2011), *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 261–275].

Další oblastí, kde sehrávají G–kvadruplexy klíčovou roli, jsou telomerické konce chromozomu [Neidle S. (2010), *FEBS Journal* 277, 1118–1125]. Lidské telomery jsou nukleoproteinové komplexy, které obsahují opakující se DNA sekvenci (5'GGGTTA3')_n (n = 100 až 4000), která má jednovláknový přesah o délce 24 až 400 bází na 3'–konci [Cimino–Reale G. a spol. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29, E35]. Telomerická DNA se každým cyklem buněčného dělení postupně zkracuje (tzv. *end replication problém*). Tento proces určuje limit celkového počtu dělení, které normální (nerakovinné) buňky mohou podstoupit. Většina rakovinných buněk tento takzvaný *end replication problém* překonává pomocí telomerázou zprostředkované extenze telomerických konců DNA. Stabilizace G–kvadruplexů v telomerách prostřednictvím malých molekul může vést k účinné inhibici aktivity telomerázy a obnovení limitace dělení buňky.

Cílení telomerických G–kvadruplexů však může ovlivnit funkci telomer i jinak než prostřednictvím inhibice telomerázy. Konce chromozomů jsou asociované se širokou škálou proteinů, které se na ně váží. Tento nukleoproteinový komplex (tzv. shelterin complex) je zodpovědný za strukturní integritu telomer *in vivo*. Malé molekuly, které se váží na v oblasti telomer, mohou uvolnit proteiny ze shelterinového komplexu a způsobit tak destabilizaci telomer. Tento proces může vést k apoptóze nebo replikativní senescenci.

Podobně jako zacílení na G–kvadruplexy v promotorech genů, je zacílení na telomerické konce chromozomu bohaté na G–kvadruplexy sledovanou strategií protirakovinné terapie.

V současnosti jsou hledány malé molekuly, které by byly schopné indukovat tvorbu komplexů G–kvadruplexu a ligandu. Takové molekuly by vedly k selektivní inhibici růstu nádorové buňky [Ou T.–M. a spol. (2008), *ChemMedChem*, 3, 690–713; Phatak P. a spol. (2007), *Br. J. Cancer*, 96, 1223–1233; Di Leva F. S. a spol. (2013) *J. Med. Chem.*, 56, 9646–54]. Příkladem malé organické molekuly, která se používá na stabilizaci G–kvadruplexů *in vitro* a *in vivo*, je TMPyP4 [Balasubramanian S. a spol. (2011), *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 261–275]. Problémem je ovšem nízká selektivita této látky vůči G–kvadruplexu v přítomnosti dvouvláknové DNA.

V současné době existuje celá řada stabilizátorů G–kvadruplexu, z nichž několik bylo i klinicky testováno. Ačkoliv tyto látky slibně omezovaly růst rakovinných buněk, žádná z nich nebyla uvedena do klinické praxe. Například quarfloxin nevykazoval dostatečnou biologickou dostupnost [Quarfloxin (CX–3543); Phase II clinical trials; NCT00780663].

Vývoj nových stabilizátorů G–kvadruplexu je stále velmi sledovanou oblastí. Žádoucí jsou zejména originální malé molekuly, účinné například pro represí transkripce onkogenů a zároveň vykazující únosné množství nepříznivých vedlejších účinků při aplikaci.

Vynález otevírá snadnou cestu k získání skupiny zcela nových látek, použitelných jako léčiva pro onemocnění, související se zvýšenou proliferací buněk a pro stabilizaci G–kvadruplexů. Strukturálně se tyto látky řadí do rodiny helquatů, organických kationtů na bázi kvartérního atomu dusíku, u nichž bylo navrženo i neléčebné použití, například ve formě sensibilizátorů ve fotografii [Táni T. (1995) *Photographic Sensitivity, Theory and Mechanisms*, OUP, Oxford].

Helikální extendované diquaty (helquaty) [Adriaenssens a spol. (2009), *Chem. Eur. J.* 15, 1072–1076; Severa a spol. (2010), *Tetrahedron* 66, 3537–3552; Vávra a spol. (2012), *Eur. J. Org. Chem.* 489–499] představují novou a téměř neprobádanou třídu látek s dikationickým helicálním skeletem. Popsané základní skelety helquatů jsou vystavěny tak, že každý obsahuje dvě kvartérní

N–heteroaromatické jednotky, které vnáší do systému dvě kladně nabitá centra, například v podobě pyridiniových, chinoliniových, nebo isochinoliniových kationických jednotek. Celé uskupení typického helquatu se tak pojí s dikationicitou a zároveň i helikální chiralitou, což je kombinace, která dříve nebyla na úrovni malých aromatických organických molekul studována.

5

Předchozí práce, zabývající se helquaty, poskytly vzhledem ke skutečnosti, že se každá připravovaná látka budovala víceúrovňovou syntézou *de novo*, jen omezenou variabilitu struktur [PV2009–237]. Další přihláška vynálezu (PV 2013–32, PCT/CZ2014/000009) předložila nejen nové deriváty helquatů, ale také způsob jejich přípravy jedнокrokovou diverzifikací stávajících methyl–substituovaných helquatů pomocí Knoevenagelovy kondenzace s arylaldehydy.

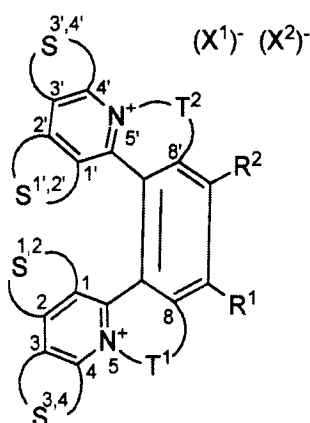
10

Nyní předkládaný vynález popisuje úplně novou skupinu helquatů, odlišujících se přítomností heteroarylového substituentu. Připraveny byly opět pomocí jedнокrokové diverzifikace methyl–substituovaných helquatů pomocí Knoevenagelovy kondenzace, ovšem se substituovanými či nesubstituovanými heteroarylaldehydy.

15

Podstata vynálezu

20 Předmětem předkládaného vynálezu jsou helquaty obecného vzorce I



(I),

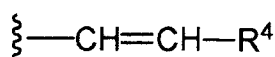
kde

25

substituenty R^1 a R^2 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny, zahrnující H a C_1 až C_4 alkyl,

nejvýše tři páry sousedících atomů v polohách 1 a 2, 3 a 4, 1' a 2', 3' a 4' jsou případně přemostěny spojkou S a zároveň jeden až čtyři atomy se sudým deskriptorem (tj. 2, 4, 2', 4') jsou substituovány substituentem R^3 obecného vzorce II

30



(II),

příčemž R^4 je substituovaný, či nesubstituovaný heteroaryl.

35

$S^{1,2}$, $S^{1',2'}$, $S^{3,4}$ a $S^{3',4'}$ je spojka tvořená uhlovodíkovým řetězcem o 3 až 6 atomech uhlíku, s výhodou uhlovodíkovým řetězcem o 4 atomech uhlíku, přičemž struktura jednotlivých spojek S je vzájemně nezávislá, a

T^1 a T^2 jsou spojky, které přemostují atomy N^5 s C^8 a $N^{5'}$ s $C^{8'}$, kde uvedená spojka je tvořena uhlovodíkovým řetězcem o 2 až 5 atomech uhlíku, s výhodou o 2 nebo 3 atomech uhlíku, přičemž struktura jednotlivých spojek T je vzájemně nezávislá,

5 kde

heteroaryl je aromatická karbocyklická skupina obsahující 4 až 26 uhlíkových atomů a alespoň jeden aromatický kruh nebo kondenzované aromatické kruhy, kde alespoň jeden atom uhlíku aromatického kruhu je nahrazen heteroatomem vybraným ze skupiny N, S, O,

10

přičemž heteroaryl může obsahovat 1 až 5 substituentů, vybraných ze skupiny, zahrnující C_1 až C_6 alkyl, C_1 až C_6 halogenalkyl, C_1 až C_{12} alkoxy, aryloxy, benzyloxy, C_1 až C_6 alkylthio, arylthio, halogen, $-OH$, $-SH$, $-NH_2$, C_1 až C_6 alkylamino, arylamino, C_1 až C_6 acylamino, $-CN$, $-SO_3H$, nitro, $-COOR_n$, $-C(=O)N(R_n)_2$, kde R_n je vodík nebo C_1 až C_6 alkyl nebo aryl;

15

a anionty $(X^1)^-$ a $(X^2)^-$ jsou na sobě nezávislé anionty solí, s výhodou anionty farmaceuticky přijatelných solí.

20

Uvedené soli zahrnují soli s alkalickými kovy, soli s anorganickými či organickými anionty a zejména, ne však výhradně, farmaceuticky přijatelné soli vhodné pro fyziologické podání.

25

Farmaceuticky přijatelné soli mohou být soli odvozené od anorganických či organických kyselin. Osoba znalá oboru bude schopná určit, které soli jsou farmaceuticky přijatelné; obzvláště se jedná o soli, mající jednu či více žádoucích fyzikálních vlastností jako zvýšenou farmaceutickou stabilitu při různých teplotách a vlhkostech, požadovanou rozpustnost ve vodě či oleji, anebo nejsou toxické.

30

Vhodné farmaceuticky přijatelné soli látek podle tohoto vynálezu s výhodou zahrnují anionty odvozené od anorganických kyselin, jako je kyselina chlorovodíková, bromovodíková, fluorovodíková, boritá, fluorboritá, fosforečná, metafosforečná, dusičná, uhličitá, siřičitá a sírová, a od organických kyselin, jako je kyselina octová, benzensulfonová, benzoová, citrónová, ethansulfonová, fumarová, glukonová, glykolová, isethionová, mléčná, laktobionová, maleinová, malonová, methansulfonová, trifluormethansulfonová, jantarová, toluensulfonová, vinná a trifluorooctová. Vhodné organické kyseliny obecně zahrnují například následující třídy organických kyselin:

35

40

Specifické příklady vhodných organických kyselin zahrnují acetát, trifluoracetát, formiát, propionát, sukcinát, glykolát, glukonát, diglukonát, laktát, malát, tartarát, citrát, askorbát, glukuronát, maleát, fumarát, pyruvát, aspartát, glutamát, benzoát, anthranilát, stearát, salicylát, p-hydroxybenzoát, fenylacetát, mandelát, pamoát, methansulfonát, ethansulfonát, benzensulfonát, pantothenát, toluensulfonát, 2-hydroxyethansulfonát, sulfanilát, cyklohexylaminosulfonát, 13-hydroxybutyrát, galaktarát, galakturonát, adipát, alginát, butyrát, kafrát, kafrsulfonát, cyklopentanpropionát, dodecylsulfát, glykoheptanoát, glycerofosfát, heptanoát, hexanoát, nikotinát, 2-naftalensulfonát, oxalát, palmoát, pektinát, 3-fenylpropionát, pikrát, pivalát, thiokyanát a undekanoát.

45

Předmětem vynálezu jsou rovněž následující helquaty:

50

2,4-bis((E)-2-(thiofen-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. HTA-C5-9

55

(E)-2-(2-(dibenzo[b,d]furan-4-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. LSA-C13-8

- (*E*)-13-(2-(5-(ethoxykarbonyl)-1*H*-pyrrol-3-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-*a*]pyrido[1,2-*k*][2,9]fenantrolin-3,10-dium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C8-28
- 5 (*E*)-13-(2-(5-brom-1*H*-indol-3-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-*a*]pyrido[1,2-*k*][2,9]fenantrolin-3,10-dium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C9-30
- 2,13-bis((*E*)-2-(5-bromthiofen-2-yl)vinylo)-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. MJB-C5-3
- 10 2,13-bis((*E*)-2-(2,6-dimethoxy-pyridin-3-yl)vinylo)-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. MJB-C8-27
- 15 19-((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-indol-2-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-*a*]chinolin-5,14-dium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C10-10
- 19-((*E*)-2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''':2''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-*a*]chinolin-5,14-dium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C10-11
- 20 19-((*E*)-2-(1*H*-benzo[*g*]indol-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''':2''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-*a*]chinolin-5,14-dium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C13-16
- 25 19-((*E*)-2-(2-fenyl-1*H*-indol-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''':2''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-*a*]chinolin-5,14-dium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C15-8
- 30 19-((*E*)-2-(1*H*-indol-5-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''':2''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-*a*]chinolin-5,14-dium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C9-10
- 35 19-((*E*)-2-(5-brom-1*H*-indol-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''':2''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-*a*]chinolin-5,14-dium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C9-30
- 4,15-bis((*E*)-4-(pyridin-2-yl)styrylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindium trifluormethansulfonát, tj. PRA-C12-5
- 40 2,4,15,17-tetra((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-indol-2-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindium trifluormethansulfonát, tj. PRC-C10-10
- 45 (*E*)-11-(2-([2,2':5',2''-tertiofen]-5-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-*a*]pyrido[1,2-*k*][2,9]fenantrolin-3,10-dium trifluormethansulfonát, tj. VDJA-C13-8
- (*E*)-11-(2-(dibenzo[*b,d*]furan-4-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-*a*]pyrido[1,2-*k*][2,9]fenantrolin-3,10-dium trifluormethansulfonát, tj. VDJA-C13-8
- 50 2,15-bis((*E*)-2-(2,6-dimethoxy-pyridin-3-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. PDA-C8-27
- 55 (*E*)-2-(2-(5-brom-1*H*-indol-3-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. LSA-C9-30

- (*E*)-13-(2-(dibenzo[b,d]furan-4-yl)vinylo)-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. MSB-C13-8
- 5 2,15-bis((*E*)-2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDA-C10-11
- 2,15-bis((*E*)-2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDA-C10-13
- 10 2,15-bis((*E*)-2-(2-fenyl-1H-indol-3-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDA-C15-8
- 2,15-bis((*E*)-2-(5-brom-1H-indol-3-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDA-C9-30
- 15 (*rac*)-(*E*)-13-(2-(dibenzo[b,d]furan-4-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C13-8
- 20 8,9-dimethyl-2,15-bis((*E*)-2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDB-C10-11
- 2,15-bis((*E*)-2-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)vinylo)-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDB-C8-14
- 25 2,4-bis((*E*)-2-(1H-indol-2-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. HTA-C10-10
- 2,4-bis((*E*)-2-([2,2'-bithiofen]-5-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. HTA-C9-16
- 30 2,4-bis((*E*)-2-(benzofuran-2-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. HTA-C9-17
- (*E*)-2-(2-([2,2'-bithiofen]-5-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. LSA-C9-16
- 35 (*E*)-13-(2-(5-hexylthiofen-2-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C11-25
- 40 (*E*)-13-(4-(9H-karbazol-9-yl)styrylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C19-4
- 8,9-dimethyl-2,13-bis((*E*)-2-(4-methyl-1H-imidazol-5-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. MJB-C5-11
- 45 19-((*E*)-2-(3-methylbenzo[b]thiofen-2-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C10-36
- 50 19-((*E*)-2-([2,2'-bithiofen]-5-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C9-16

- 19-((*E*)-2-(6-brom-1*H*-indol-3-yl)vinylyl)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C9-18
- 5 2,15-bis((*E*)-2-(4-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)vinylyl)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDA-C5-11
- 2,15-bis((*E*)-2-(dibenzo[b,d]furan-4-yl)vinylyl)-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDB-C13-8
- 10 (*rac*)-2,4,13,15-tetrakis((*E*)-2-(thiofen-3-yl)vinylyl)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-a:1',2'-a']benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindiiium trifluormethansulfonát, tj. PRC-C5-9
- (*E*)-13-(2-(dibenzo[b,d]furan-2-yl)vinylyl)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C13-22
- 15 (*E*)-13-(2-(4-fenylthiofen-2-yl)vinylyl)-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. MSB-C11-7
- (*E*)-13-(2-(1*H*-benzo[g]indol-3-yl)vinylyl)-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. MSB-C13-16
- 20 19-((*E*)-2-(7-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinylyl)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát, tj. MSC-C10-31
- 25 (*E*)-11-(2-(dibenzo[b,d]thiofen-4-yl)vinylyl)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. VDJA-C13-20
- (*rac*)-(*E*)-13-(2-(9-ethyl-9*H*-karbazol-3-yl)vinylyl)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C15-1
- 30 (*rac*)-8,9-dimethyl-2,13-bis((*E*)-2-(thiofen-3-yl)vinylyl)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. MJB-C5-9
- 35 (*rac*)-2,15-bis((*E*)-2-(1*H*-indol-3-yl)vinylyl)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-a:1',2'-a']benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindiiium trifluormethansulfonát, tj. MJC-C9-7
- 40 4,13-bis((*E*)-2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinylyl)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. VDJC-C10-11
- (*E*)-11-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl)vinylyl)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. VDJA-C8-5
- 45 (*E*)-6,7-dimethyl-11-(2-(5-fenylthiofen-2-yl)vinylyl)-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. VDJA-C11-13
- (*rac*)-(*E*)-2-(2-(4-nitro-1*H*-indol-3-yl)vinylyl)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. LSA-C9-32
- 50 (*rac*)-(*E*)-2-(2-(6-isopropyl-1*H*-indol-3-yl)vinylyl)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-a:1',2'-a']benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindiiium trifluormethansulfonát, tj. PSA-C12-6

(*rac*)-2,17-bis((*E*)-2-(1*H*-indol-5-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindium trifluormethansulfonát, tj. PRB-C9-10

5 (*rac*)-4,15-bis((*E*)-2-(2,5-dimethyl-1-(3-(trifluormethyl)fenyl)-1*H*-pyrrol-3-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindium trifluormethansulfonát, tj. PRA-C14-6

10 8,9-dimethyl-2,15-bis((*E*)-2-(2-fenyl-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. PDB-C15-8

(*rac*)-2,4,15,17-tetrakis((*E*)-2-(1*H*-indol-2-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindium trifluormethansulfonát, tj. PRC-C9-11

15 (*rac*)-2,4-bis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. HTA-C6-4

(*rac*)-2,4-bis((*E*)-2-(4-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. HTA-C5-11

20 2,4,13,15-tetrakis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. TKA-C10-13

Dále jsou předmětem vynálezu helquaty obecného vzorce I nebo konkrétní výše uvedené helquaty podle tohoto vynálezu, či jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro použití jako léčiva.

25 Předmětem vynálezu jsou dále helquaty obecného vzorce I nebo konkrétní výše uvedené helquaty podle tohoto vynálezu, či jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro použití ke stabilizaci G-kvadruplexů.

30 Dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou helquaty obecného vzorce I nebo konkrétní výše uvedené helquaty podle tohoto vynálezu, či jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro použití jako léčiva k léčbě onkologických onemocnění.

35 Helquaty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo konkrétní výše uvedené helquaty podle tohoto vynálezu, či jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro použití k léčbě onemocnění souvisejících se zvýšenou proliferací buněk a k léčbě, vyžadující ovlivnění G-kvadruplexu, s výhodou v telomerech nebo v promotorech genů.

40 Předmětem vynálezu je také farmaceutický prostředek, obsahující alespoň jeden helquat obecného vzorce I podle tohoto vynálezu, nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.

45 Význakem tohoto vynálezu je rovněž farmaceutický prostředek, který obsahuje alespoň jeden helquat obecného vzorce I podle tohoto vynálezu, nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, případně i další aktivní složku a popřípadě alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič, plnivo nebo ředidlo.

Předmětem vynálezu je dále farmaceutický prostředek, obsahující alespoň jeden helquat obecného vzorce I podle tohoto vynálezu, nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, pro použití k léčbě onkologických onemocnění, nemocí souvisejících se zvýšenou proliferací buněk a k léčbě, vyžadující ovlivnění G-kvadruplexu, s výhodou v telomerech nebo v promotorech genů.

Předmětem vynálezu je také použití helquatů obecného vzorce I podle nároku 1, nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, pro přípravu léčiva.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je i použití helquatů obecného vzorce I podle tohoto vynálezu, nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, pro výrobu léčiva k léčbě onkologických onemocnění, onemocnění souvisejících se zvýšenou proliferací buněk a k léčbě, vyžadující ovlivnění G–kvadruplexu, s výhodou v telomerech nebo v promotorech genů.

5

Vývoj nových stabilizátorů G–kvadruplexu je stále velmi žádoucí. Uplatní se zejména originální malé molekuly, účinné pro represi transkripce onkogenů a vykazující současně únosné množství nepříznivých vedlejších účinků. Pro komerční přípravu a využití nových stabilizátorů G–kvadruplexu je rovněž důležitou otázkou snadnost syntézy takových látek. Výhodou zde předkládaných helquatů je skutečnost, že jejich izolaci lze provést bez použití chromatografie, což přináší úspory času i materiálu.

10

Nově připravené helquaty překvapivě prokázaly významnou účinnost při stabilizaci G–kvadruplexů. Představují tak velmi nadějnou novou skupinu látek, vhodných pro aplikace spojené se stabilizací G–kvadruplexu. Jsou využitelné k ovlivnění exprese proteinů, spojených s procesy nezbytnými pro vznik a rozvoj nádorových onemocnění, jako jsou např. proliferace, růst, invazivita, metastázování, přežití/odolnost vůči apoptóze, angiogeneze, a podobně. Mezi takové proteiny patří transkripční faktory *c-myc*, *c-myb*, HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF, vascular endothelial growth factor), destičkový růstový faktor (PDGFA, platelet-derived growth factor α polypeptide), KRAS, protein BCL–2 (B cell lymphoma 2), receptor pro destičkový růstový faktor (PDGFR β , PDGF receptor β polypeptide), proteinová podjednotka lidské telomerázy (TERT, human telomerase reverse transcriptase), ADAM–15.

15

20

Schopnost stabilizace G–kvadruplexu byla demonstrována pomocí *in vitro* experimentů: FRET analýzy a ECD spektroskopie.

25

Ovlivnění exprese proteinů použitím helquatů, které jsou předmětem vynálezu, byla demonstrována pomocí duální luciferázové reportérové (DLR) analýzy a Western Blotu.

30

Měření interakce G–kvadruplexu s ligandem pomocí FRET analýzy je zavedeným a běžně používaným přístupem pro stanovení schopnosti ligandu stabilizovat G–kvadruplex. Tato metoda zároveň umožňuje stanovit selektivitu ligandu vůči G–kvadruplexu ve srovnání s dvouvláknovou DNA [De Cian A. a spol. (2007) *Methods*, 42, 183–195]. Řada takto testovaných helquatů prokázala schopnost významně stabilizovat G–kvadruplexy, které se tvoří v důležité části regulační sekvence promotoru *c-myc* genu (tab. 1) a v lidských telomerech (tab. 2) a to i v přítomnosti nadbytku kompetitoru, představujícího dvouvláknovou DNA (ds26). Bylo zjištěno, že ve srovnání s G–kvadruplexovým ligandem TMPyP4, který se běžně používá jako pozitivní kontrola, stabilizují helquaty podle tohoto vynálezu G–kvadruplex s podstatně větší selektivitou.

35

40

Měření ECD spekter je další z citlivých metod, umožňující určit míru stabilizace G–kvadruplexu v přítomnosti ligandu. ECD spektroskopie potvrdila schopnost vybraných helquatů (tab. 4) významně stabilizovat *c-myc* promotorový G–kvadruplex. Dokládají to experimenty používající modelový oligonukleotid *c-Myc27*, který má stejnou sekvenci jako NHE III₁ segment v *c-myc* regulační oblasti.

45

Pomocí duální luciferázové analýzy byla na buněčné úrovni zjištěna neobvykle vysoká schopnost helquatů inhibovat expresi luciferázy, která je řízena regulační oblastí *c-myc* genu obsahující NHE III₁ segment. NHE III₁ obsahuje G–bohatou sekvenci schopnou tvorby paralelního G–kvadruplexu. Je prokázáno, že stabilizace *c-myc* promotorového G–kvadruplexu v NHE III₁ segmentu vede ke snížení exprese *c-myc* transkripčního faktoru, případně reportérového enzymu (*firefly* luciferáza), jehož exprese je touto regulační oblastí řízena [Siddiqui–Jain A. a spol. (2002) *PNAS*, 99, 11593–11598; Brooks T. A. (2010), *Genes & Cancer*, 1, 641–649]. Analýza například ukázala, že pět helquatů (VDJA–C13–6, LSA–C13–8, MJA–C9–30, MJA–C13–8, MSC–C9–10) inhibovalo expresi *firefly* luciferázy více než o 40 % ve srovnání s kontrolou (tab. 5). V případě

55

- látky VDJA-C13-6 se jednalo o inhibici exprese o více než 70 %). Devět helquatů (VDJA-C13-8, MSC-C10-11, MSC-C9-30, MJB-C5-9, MJB-C5-3, LSA-C9-32, MJA-C8-28, MSC-C15-8, PDA-C8-27) inhibovalo expresi o více než 20 % a dalších pět látek (HTA-C5-9, MJB-C8-27, MSC-C13-16, MSC-C10-10, PRA-C12-5) o více než 10 % ve srovnání s kontrolou.
- 5 Výsledky byly potvrzeny minimálně dvěma nezávislými experimenty (každý v tetraplikátu). U dvou látek, MJA-C13-8 a VDJA-C13-6, byla také prokázána koncentrační závislost uvedeného inhibičního efektu (tab. 6). Detailní výsledky jsou uvedeny níže, v sekci nazvané "Stabilizace G-kvadruplexu promotorové oblasti *c-myc* genu".
- 10 Pomocí metody imunodetekce byl na buněčné úrovni stanoven krátkodobý (24 hodin) vliv helquatů na expresi *c-myc* proteinu. V experimentech byla použita nádorová buněčná linie HGC-27 overexprimující *c-myc* protein. Helquaty uvedené v tabulce 7 snižovaly množství *c-myc* proteinu minimálně o 15 % a u více než poloviny látek bylo zjištěno snížení ve srovnání s kontrolou převyšující 40 %.
- 15 Výsledky byly potvrzeny minimálně dvěma nezávislými experimenty. U nezanedbatelného počtu helquatů (MSC-C9-30, LSA-C13-8, MJA-C8-28, MJB-C5-9, MJA-C13-8, MSC-C15-8, PRC-C10-10, VDJA-C13-8) tak byla zjištěna shoda mezi výsledky ovlivnění exprese reportérového enzymu řízeného *c-myc* regulační oblastí získanými v duální luciferázové analýze a výsledky stanovení množství *c-myc* proteinu v nádorových buňkách.
- 20 Antiproliferační účinky helquatů byly testovány pomocí XTT cytotoxicitního/proliferačního testu na nádorové buněčné linii CCRF-CEM a normální (nenádorové) buněčné linii endoteliálních buněk z unbilikální vény HUVEC po dobu 72 hodin. Helquaty uvedené v tabulce 9 byly výrazně toxičtější vůči nádorové buněčné linii a netoxické, nebo méně toxické, vůči linii nenádorové.
- 25 Deset testovaných helquatů (MSC-C13-16, MSC-C9-30, MJA-C13-22, MSC-C9-16, MSC-C9-10, MSC-C10-10, MSB-C11-7, MSC-C10-11, VDJA-C13-20, LSA-C9-32) bylo toxic-
kých vůči CCRF-CEM buňkám v koncentraci nižší než 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a netoxických vůči HUVEC buňkám v koncentraci vyšší než 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Naměřené hodnoty IC_{50} byly získány z minimálně tří nezávislých experimentů.
- 30 Vynález bude dále ozřejměn příklady provedení, které ho však žádným způsobem nelimitují.

Objasnění výkresů

- 35 Obr. 1 znázorňuje spektra ECD oligonukleotidu *c-Myc27* při teplotách 25 °C a 95 °C; svislá čára odpovídá maximálnímu rozdílu signálu spekter a určuje vlnovou délku zvolenou pro sledování tání struktury G-kvadruplexu.

- 40 Obr. 2 znázorňuje závislost intenzity ECD detekované u 263 nm na teplotě roztoku oligonukleotidu *c-Myc27* v přítomnosti ligandu PDB-C10-11 (molární poměr oligonukleotid : ligand = 1:1).

Příklady uskutečnění vynálezu

- 45 Číselné údaje chemických posunů v NMR spektrech jsou uvedeny v ppm.

Notace v NMR spektrech: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), m (multiplet).

Seznam zkratk:

- 50 ATCC/LGC American Type Cell Collection dle LGC standardů
BCA metoda metoda stanovení množství proteinu založená na použití 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylové kyseliny

	<i>c-myc</i>	gen kódující transkripční faktor <i>c-myc</i> (avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog)
	<i>c-myc</i>	transkripční faktor <i>c-myc</i>
	DMSO	dimethylsulfoxid
5	ds26	oligonukleotid tvořící dvouvláknovou vlásenku
	ΔT_m	rozdíl teplot tání
	ECD	elektronický cirkulární dichroismus
	EDTA	disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
	EGF	epidermální růstový faktor
10	F21T	sekvence z lidské telomery dlouhá 21 nukleotidů, značená na 5'-konci FAM a na 3'-konci TAMRA
	FAM	fluorescein
	<i>firefly</i> luciferáza	luciferáza odvozená z luciferázy světlušek
15	Fmyc27T	sekvence z promotoru <i>c-myc</i> genu dlouhá 27 nukleotidů, schopná vytvářet G-kvadruplex, značená na 5'-konci FAM a na 3'-konci TAMRA
	FBS	fetální hovězí sérum
	FRET	Försterův rezonanční přenos energie
	G	guanin
20	<i>c-Myc27</i>	sekvence z promotoru <i>c-myc</i> genu dlouhá 27 nukleotidů, schopná vytvářet G-kvadruplex
	h	hodina
	HGC-27	lidská buněčná linie odvozená z metastatické lymfatické uzliny pacienta se žaludečním nádorem
25	NHE III1	nukleázový hypersenzitivní element (NHE) III 1 v oblasti promotoru <i>c-myc</i> genu
	HRP	křenová peroxidáza
	HSV-TK	promotor thymidin kinázy viru herpes simplex (HSV)
30	IC ₅₀	koncentrace testované látky, působící pokles počtu viabilních buněk na polovinu (tj. 50% zpomalení dělení buněk) vzhledem ke kontrolní, neovlivněné populaci
	PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
	PCR	polymerázová řetězová reakce
	pGL4.10 (<i>luc2</i>)	vektor kódující <i>firefly</i> luciferázu bez promotoru
	pGL4.10- <i>myc</i> (<i>luc2</i>)	vektor kódující <i>firefly</i> luciferázu s regulační oblastí <i>c-myc</i>
35	PhIC	směs inhibitorů fosfatáz
	PMS	phenazine methosulfate
	PrIC	směs inhibitorů proteáz
	pRL-TK	savčí ko-reporterový vektor s nízkou konstitutivní expresí Renilla luciferázy
40	PVDF membrána	membrána z polyvinyliden difluoridu
	RIPA	radioimunoprecipitační pufr (radioimmunoprecipitation assay buffer)
	SD	směrodatná odchylka
	SDS-PAGE	polyakrylamidový gel s dodecylsíránem sodným pro elektroforézu
	TAMRA	karboxytetramethylrhodamin

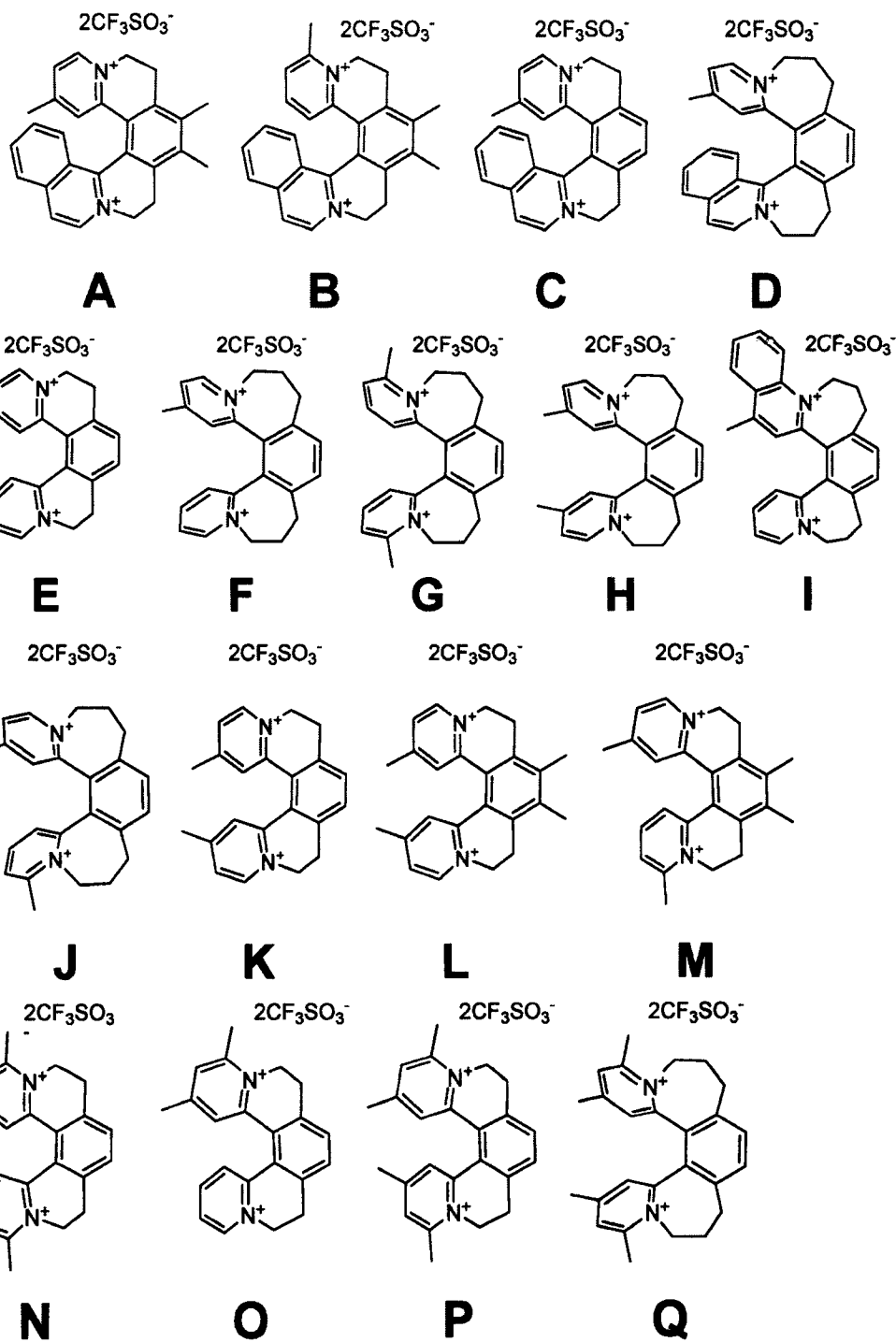
TBS-T

roztok tris(hydroxymethyl)aminomethanu, chloridu sodného a Tween-20
(50 mmol.l⁻¹ Tris, 150 mmol.l⁻¹ NaCl, 0,05% Tween-20)

I. Syntéza látek

5

Struktury výchozích helquatů A až Q jsou následovné:

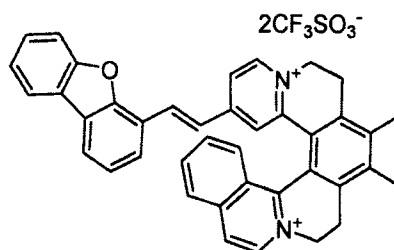


10

Příklad 1

(*rac*)-(*E*)-13-(2-(Dibenzo[b,d]furan-4-yl)viny)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolin[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-dium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C13-8

Výchozí helquat A (40 mg, 1 ekv., 59 μmol), dibenzo[b,d]furan-4-karbaldehyd (60 mg, 5 ekv., 306 μmol), pyrrolidin (30 mg, 35 μl , 7 ekv., 419 μmol) a suchý methanol (1 ml) byly umístěny do baňky o objemu 5 ml a směs byla míchána pod argonem po dobu 2 h za teploty místnosti. Postup reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (40 ml). Suspenze byla odstředěna a kapalný podíl byl oddělen od pevné látky. Pevný podíl byl částečně rozpuštěn v methanolu (3 ml), směs byla promíchána a rozpuštěný produkt byl vysrážen přidáním diethyletheru (40 ml). Následovalo odstředění této suspenze, odstranění kapalného podílu a se získaným pevným podílem byla tato procedura ještě dvakrát zopakována. Pevný podíl byl poté vysušen pod vakuem za použití olejové pumpy. Takto bylo získáno 36 mg (42 μmol , 71% výtěžek) světle žluté pevné látky MJA-C13-8.

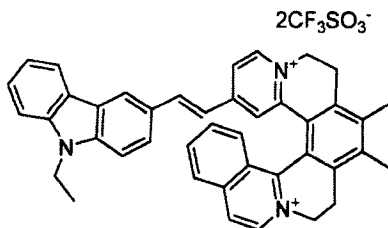


^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6): 2,67 (s, 3H), 2,67 (s, 3H), 3,31 (m, 2H), 3,69 (dq, $J = 5,4, 1,9$ Hz, 1H), 3,73 (ddd, $J = 7,5, 3,4, 1,7$ Hz, 1H), 5,04 (m, 3H), 5,21 (ddd, $J = 13,9, 4,5, 1,6$ Hz, 1H), 7,16 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,35 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H), 7,43 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H), 7,57 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,60 (td, $J = 7,7, 0,9$ Hz, 1H), 7,69 (dd, $J = 7,7, 0,8$ Hz, 1H), 7,76 (ddd, $J = 9,7, 6,7, 1,3$ Hz, 2H), 7,82 (dd, $J = 6,6, 1,9$ Hz, 1H), 8,15 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,24 (dd, $J = 7,7, 0,5$ Hz, 1H), 8,25 (dd, $J = 7,6, 1,2$ Hz, 1H), 8,49 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 8,68 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H), 8,90 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H).

Příklad 2

(*rac*)-(*E*)-13-(2-(9-Ethyl-9H-karbazol-3-yl)viny)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-dium trifluormethansulfonát, tj. MJA-C15-1

Výchozí helquat A (100 mg, 1 ekv., 148 μmol), 9-ethyl-9H-karbazol-3-karbaldehyd (66 mg, 2 ekv., 296 μmol), pyrrolidin (74 mg, 86 μl , 7 ekv., 1,035 mmol) a suchý methanol (1 ml) byly umístěny do baňky o objemu 5 ml a směs byla míchána pod argonem po dobu 2 h za teploty místnosti. Postup reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (40 ml). Suspenze byla odstředěna a kapalný podíl byl oddělen od pevné látky. Pevný podíl byl částečně rozpuštěn v methanolu (5 ml), směs byla promíchána a rozpuštěný produkt byl vysrážen přidáním diethyletheru (40 ml). Následovalo odstředění této suspenze, odstranění kapalného podílu a se získaným pevným podílem byla tato procedura ještě dvakrát zopakována. Pevný podíl byl poté vysušen pod vakuem za použití olejové pumpy. Takto bylo získáno 67 mg (76 μmol , 51% výtěžek) světle žluté pevné látky MJA-C15-1.



¹H NMR (400 MHz, aceton-d₆) δ 1,45 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 3,11 (td, J = 16,0, 4,5 Hz, 1H), 3,26 (m, 2H), 3,58 (dd, J = 15,3, 1,6 Hz, 1H), 4,58 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 5,00 (td, J = 14,1, 3,6 Hz, 1H), 5,13 (dd, J = 13,8, 3,7 Hz, 1H), 5,29 (m, 2H), 6,77 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,35 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 7,43 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,60 (m, 4H), 7,69 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 7,78 (dd, J = 6,7, 1,8 Hz, 1H), 7,82 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,90 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,03 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,27 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,41 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 8,74 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 8,97 (d, J = 6,7 Hz, 1H).

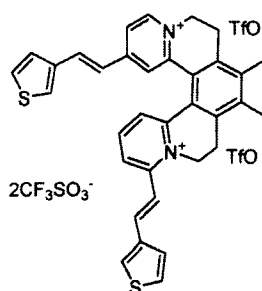
10

Příklad 3

¹⁵ (*rac*)-8,9-dimethyl-2,13-bis(*E*)-2-(thiofen-3-yl)vinyl)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. MJB-C5-9

²⁰ Výchozí helquat M (40 mg, 1 ekv., 62 μmol), thiofen-3-karbaldehyd (210 mg, 30 ekv., 1,873 mmol), pyrrolidin (67 mg, 78 μl, 15 ekv., 937 μmol) a suchý methanol (1 ml) byly umístěny do baňky o objemu 5 ml a směs byla míchána pod argonem po dobu 12 h za teploty místnosti. Postup reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (40 ml). Suspenze byla odstředěna a kapalný podíl byl oddělen od pevné látky. Pevný podíl byl částečně rozpuštěn v methanolu (5 ml), směs byla promíchána a rozpuštěný produkt byl vysrážen přidáním diethyletheru (40 ml). Následovalo odstředění této suspenze, odstranění kapalného podílu a se získaným pevným podílem byla tato procedura ještě dvakrát zopakována. Pevný podíl byl poté vysušen pod vakuem za použití olejové pumpy. Takto bylo získáno 48 mg (43 μmol, 69% výtěžek) světle žluté pevné látky MJB-C5-9.

25



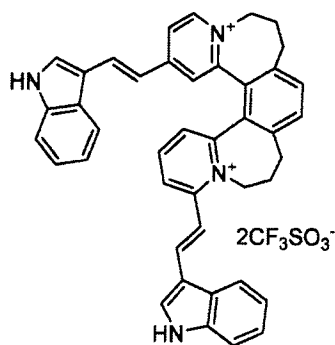
³⁰ ¹H NMR (400 MHz, acetonitril-d₃) δ 2,44 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 3,03 (m, 2H), 3,45 (m, 2H), 4,53 (td, J = 14,6, 3,4 Hz, 1H), 4,61 (td, J = 15,6, 15,2, 3,7 Hz, 1H), 4,83 (dd, J = 14,0, 4,0 Hz, 1H), 5,30 (dd, J = 14,2, 3,3 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 16,3 Hz, 1H), 7,38 (dd, J = 5,1, 1,0 Hz, 1H), 7,46 (dd, J = 5,1, 2,9 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,60 (dd, J = 5,4, 3,2 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,66 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 7,88 (dd, J = 7,3, 2,5 Hz, 1H), 7,89 (dd, 2,9, 1,0 Hz, 1H), 8,00 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 8,06 (dd, J = 8,2, 1,4 Hz, 1H), 8,56 (d, J = 6,6 Hz, 1H).

35

Příklad 4

5 *(rac)*-2,15-bis(*E*)-2-(1H-indol-3-yl)vinylo-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-a:1',2'-a']benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindiiium trifluormethansulfonát, tj. MJC-C9-7

Výchozí helquat **J** (35 mg, 1 ekv., 55 μ mol), 1*H*-indol-3-karbaldehyd (238 mg, 30 ekv., 1,639 mmol), pyrrolidin (58 mg, 68 μ l, 15 ekv., 820 μ mol) a suchý methanol (1 ml) byly umístěny do baňky o objemu 5 ml a směs byla míchána pod argonem po dobu 16 h za teploty místnosti. Postup reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (40 ml). Suspenze byla odstředěna a kapalný podíl byl oddělen od pevné látky. K pevnému podílu byl přidán diethylether (35 ml), suspenze byla promíchána a odstředěna. Získaný pevný podíl byl částečně rozpuštěn v methanolu (3 ml), směs byla promíchána a rozpuštěný produkt byl vysrážen přidáním diethyletheru (40 ml). Následovalo odstředění této suspenze, odstranění kapalného podílu a se získaným pevným podílem byla tato procedura ještě dvakrát zopakována. Pevný podíl byl poté vysušen pod vakuem za použití olejové pumpy. Takto bylo získáno 32 mg (36 μ mol, 66% výtěžek) červené pevné látky MJC-C9-7.



20

^1H NMR (400 MHz, acetonitril- d_3) δ 2,34 (m, 2H), 2,49 (m, 2H), 2,61 (m, 1H), 2,80 (m, 1H), 2,99 (dd, $J = 14,1, 6,5$ Hz, 1H), 3,07 (m, 1H), 4,35 (td, $J = 13,4, 5,0$ Hz, 1H), 4,40 (dd, $J = 15,6, 5,3$ Hz, 1H), 4,58 (dd, $J = 13,9, 6,3$ Hz, 1H), 5,13 (dd, $J = 14,6, 5,5$ Hz, 1H), 6,98 (dd, $J = 7,7, 1,1$ Hz, 1H), 7,03 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 7,12 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,22 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,30 – 7,38 (m, 3H), 7,50 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,59 (dd, $J = 6,0, 2,8$ Hz, 1H), 7,68 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,70 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,88 – 8,01 (m, 5H), 8,02 – 8,06 (m, 1H), 8,09 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 8,20 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 8,51 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H).

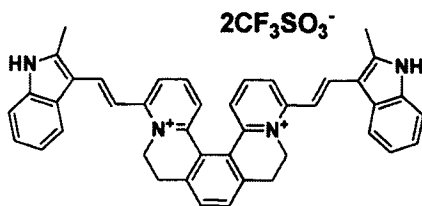
25

30 Příklad 5

4,13-bis(*E*)-2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)vinylo-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diiium trifluormethansulfonát, tj. VDJC-C10-11

35 Výchozí racemický helquat **N** (10 mg, 16,3 μ mol), 2-methyl-1H-indol-3-karbaldehyd (78 mg, 489,7 μ mol), pyrrolidin (20 μ l, 244,8 μ mol), a suchý methanol (1 ml) byly dány do 10 ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 24 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (8 ml). Vzniklá suspenze byla odstředěna a supernatant byl oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v acetonitrilu (6 ml) a čistý produkt byl vysrážen přidáním diethyletheru (36 ml). Potom odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k 8,7 mg (9,8 μ mol, 60% výtěžek) oranžové pevné látky VDJC-C10-11.

40

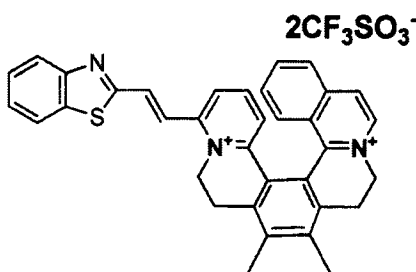


¹H NMR (400 MHz, acetonitril-d₃): 2,68 (s, 6H), 3,08–3,23 (m, 4H), 4,31–4,58 (m, 2H), 5,16–5,36 (m, 2H), 7,27–7,33 (m, 6H), 7,48 (dd, *J* = 2,1, 5,6 Hz, 2H), 7,50 (dd, *J* = 1,3, 7,9 Hz, 2H), 7,69 (s, 2H), 7,91 (t, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,99 (d, *J* = 15,5 Hz, 2H), 8,06 (dd, *J* = 2,0, 5,4 Hz, 2H), 8,21 (dd, *J* = 1,1, 8,4 Hz, 2H), 10,15 (bs, 2H).

Příklad 6

(*E*)-11-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl)vinyl)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydro isochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. VDJA-C8-5

Výchozí racemický helquat B (20 mg, 29,6 μmol), benzo[d]thiazol-2-karbaldehyd (121 mg, 739 μmol), pyrrolidin (30 μl, 367,2 μmol) a suchý acetonitril (2 ml) byly dány do 10 ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 1 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (16 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant byl oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (2 ml) a čistý produkt byl vysrážen přidáním diethyletheru (12 ml). Potom odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k 14 mg (17,0 μmol, 58% výtěžek) oranžové pevné látky VDJA-C8-5.



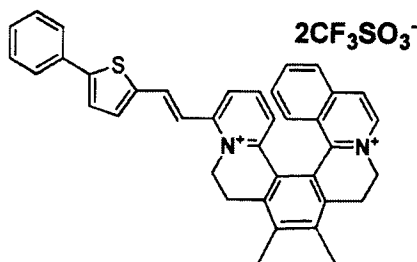
¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆): 2,67 (s, 3H), 2,68 (s, 3H), 3,49–3,54 (m, 2H), 3,82 (dq, *J* = 1,7, 17,1 Hz, 1H), 3,89 (dq, *J* = 1,7, 17,1 Hz, 1H), 5,17 (dt, *J* = 3,4, 14,6 Hz, 1H), 5,33 (dt, *J* = 3,7, 14,0 Hz, 1H), 5,40 (dd, *J* = 1,6, 13,9 Hz, 1H), 5,75 (dd, *J* = 1,6, 13,9 Hz, 1H), 7,61 (dt, *J* = 1,2, 7,2 Hz, 1H), 7,64 (dt, *J* = 1,3, 8,2 Hz, 1H), 7,69 (dt, *J* = 1,3, 7,2 Hz, 1H), 7,88 (dt, *J* = 1,2, 6,8 Hz, 1H), 7,91 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,00 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H), 8,02 (t, *J* = 1,2 Hz, 1H), 8,17 (dq, *J* = 0,7, 8,1 Hz, 1H), 8,18 (dd, *J* = 0,8, 8,7 Hz, 1H), 8,22 (dq, *J* = 0,7, 8,1 Hz, 1H), 8,24 (dd, *J* = 1,3, 8,1 Hz, 1H), 8,31 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 8,41 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H), 8,58 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 9,06 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H).

Příklad 7

(*E*)-6,7-dimethyl-11-(2-(5-fenylthiofen-2-yl)vinyl)-4,5,8,9-tetrahydro isochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát, tj. VDJA-C11-13

Výchozí racemický helquat B (10 mg, 14,78 μmol), 5-fenylthiofen-2-karbaldehyd (53,87 mg, 147,8 μmol), pyrrolidin (15 μl, 183,6 μmol), a suchý methanol (1 ml) byly dány do 10 ml baňky

a výsledná směs byla míchána pod argonem 2 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (8 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant byl oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (2 ml) a čistý produkt byl vysrážen přidáním diethyletheru (16 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k zisku 9,0 mg (10,6 μmol , 72% výtěžek) žluté pevné látky VDJA-C11-13.

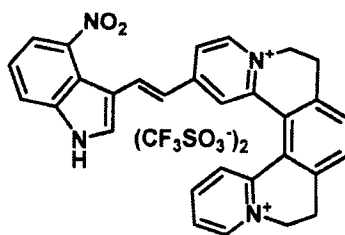


^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6): 2,64 (s, 3H), 2,65 (s, 3H), 3,11–3,31 (m, 2H), 3,62 (dd, $J = 2,0$, 17,2 Hz, 1H), 3,66 (dd, $J = 1,7$, 17,4 Hz, 1H), 4,80 (dt, $J = 2,6$, 13,0 Hz, 1H), 4,89 (dt, $J = 2,6$, 13,0 Hz, 1H), 5,10 (dd, $J = 2,1$, 13,9 Hz, 1H), 5,39 (dd, $J = 2,1$, 13,9 Hz, 1H), 6,95 (dd, $J = 1,1$, 6,8 Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H), 7,54 (dt, $J = 7,3$, 1,4, 2,16 Hz, 1H), 7,59 (dd, $J = 1,5$, 2,2 Hz, 1H), 7,61 (d, $J = 3,9$, 1H), 7,63 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 7,64 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 7,66 (d, $J = 3,9$, 1H), 7,76 (dd, $J = 1,2$, 7,3 Hz, 1H), 7,86–7,91 (m, 5H), 7,99 (dd, $J = 1,1, 7,1$ Hz, 1H), 8,22 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 8,40 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 8,70 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H).

Příklad 8

(*rac*)-(E)-2-(2-(4-nitro-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. LSA-C9-32

Výchozí racemický helquat E (12,7 mg, 21,2 μmol , 1 ekv.), 4-nitro-1*H*-indol-3-karbaldehyd (52,3 mg, 275,0 μmol , 13 ekv.), piperidin (25 μl , 21,7 mg, 254,6 μmol , 12 ekv.) a suchý methanol (1 ml) byly dány do Schlenkovy zkumavky a výsledná směs byla míchána pod argonem 6 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (15 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant byl oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (1 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (15 ml) celkem dvakrát. Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu LSA-C9-32 na vakuu olejové pumpy vedlo k zisku 13,1 mg (17,0 μmol , 80% výtěžek) tmavé pevné látky.

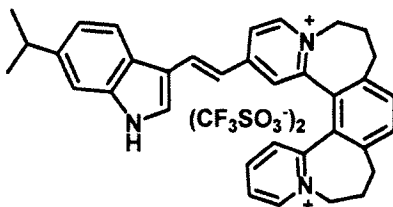


^1H NMR (400 MHz, acetonitril- d_3 -1.94): 3,25–3,33 (m, 4H), 4,60–4,98 (m, 4H), 6,82 (d, $J = 16,0$, 1H), 7,32 (t, $J = 8,0$; 8,0 Hz, 1H), 7,68–7,70 (m, 4H), 7,87–7,91 (m, 2H), 7,96 (dd, $J = 8,0$; 1,0 Hz, 1H), 7,98 (dd, $J = 15,9$; 0,7 Hz, 1H), 8,06 (dd, $J = 8,3$; 1,5 Hz, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,20 (td, $J = 7,9$; 7,9; 1,5 Hz, 1H), 8,45 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 8,86 (dd, $J = 6,4$; 1,3 Hz, 1H).

Příklad 9

5 *(rac)*-(*E*)-2-(2-(6-isopropyl-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindiiium trifluormethansulfonát, tj. PSA-C12-6

Výchozí racemický helquat F (14,2 mg, 22,7 μmol , 1 ekv.), 6-isopropyl-1*H*-indol-3-karbaldehyd (63,2 mg, 337,5 μmol , 15 ekv.), pyrrolidin (15 μl , 12,9 mg, 181,3 μmol , 8 ekv.) a suchý methanol (1 ml) byly dány do Schlenkovy zkumavky a výsledná směs byla míchána pod argonem 1,5 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (15 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v acetonitrilu (1 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (15 ml) celkem dvakrát. Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuum olejové pumpy vedlo k zisku 13,7 mg (17,2 μmol , 76% výtěžek) hnědé pevné látky PSA-C12-6.



20 ^1H NMR (400 MHz, acetonitril- d_3 -1.94): 1,28 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H), 2,26–2,72 (m), 2,96–3,06 (m), 4,28–4,36 (m, 1H), 4,53 (dd, $J = 14,0$; 6,1 Hz, 1H), 4,63 (td, $J = 13,4$; 13,2; 5,6 Hz, 1H), 4,86 (dd, $J = 13,6$; 6,3 Hz, 1H), 6,90 (d, $J = 16,0$, 1H), 6,93 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,16 (dd, $J = 8,3$; 1,6 Hz, 1H), 7,39–7,41 (m, 2H), 7,69 (s, 2H), 7,71 (s, 1H), 7,83–7,90 (m, 3H), 7,93 (ddd, $J = 7,8$; 6,2; 1,5 Hz, 1H), 8,23 (td, $J = 7,9$; 7,9; 1,5 Hz, 1H), 8,45 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H), 8,91 (dd, $J = 6,2$; 1,8 Hz, 1H).

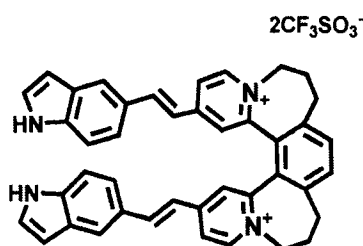
25

Příklad 10

30 *(rac)*-2,17-bis((*E*)-2-(1*H*-indol-5-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindiiium trifluormethansulfonát, tj. PRB-C9-10

Výchozí racemický helquat H (30 mg, 47 μmol , 1 ekv.), 1*H*-indol-5-karbaldehyd (204 mg, 1.40 mmol, 30 ekv.), piperidin (74 ml, 750 μmol) a suchý methanol (1 ml) byly dány do 10 ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 1 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (34 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (2 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (34 ml) celkem čtyřikrát. Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuum olejové pumpy vedlo k zisku 24 mg (27 μmol , 57% výtěžek) oranžové pevné látky PRB-C9-10.

40

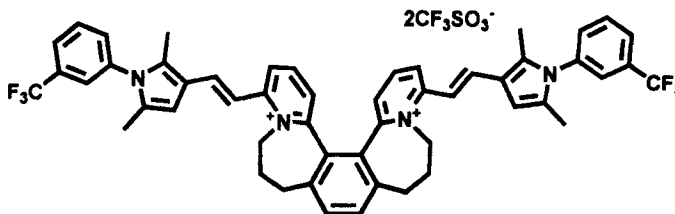


¹H NMR (400 MHz, acetonitril-d₃): 2,34–2,44 (m, 1H), 2,46–2,67 (m, 1H), 2,60–2,69 (m, 1H), 3,01 (dd, *J* = 6,2, 13,7 Hz, 1H), 4,46 (td, *J* = 5,6, 13,2 Hz, 1H), 4,71 (dd, *J* = 6,2, 13,8 Hz, 1H), 6,53–6,54 (m, 1H), 7,09 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,31–7,32 (m, 1H), 7,43–7,50 (m, 2H), 7,70 (s, 1H), 7,72 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,99 (dd, *J* = 1,9, 6,7 Hz, 1H), 8,66 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 9,63 (bs, 1H).

Příklad 11

(*rac*)-4,15-bis((*E*)-2-(2,5-dimethyl-1-(3-(trifluormethyl)fenyl)-1H-pyrrol-3-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-a:1',2'-a']benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindiiium trifluormethansulfonát, tj. PRA-C14-6

Výchozí racemický helquat G (30 mg, 47 μmol, 1 ekv.), 2,5-dimethyl-1-(3-(trifluormethyl)fenyl)-1H-pyrrol-3-ylkarbaldehyd (375 mg, 1,40 mmol, 30 ekv.), pyrrolidin (62,5 ml, 750 μmol) a suchý methanol (1 ml) byly dány do 10 ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 30 min za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (34 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (2 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (34 ml) celkem čtyřikrát. K pevnému podílu byl přidán THF (0,5 ml) a suspenze byla odstředěna. Po odstranění supernatantu byl pevný podíl přečištěn dvakrát diethyletherem (5 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k zisku 34 mg (30 μmol, 64% výtěžek) žluté pevné látky PRA-C14-6.

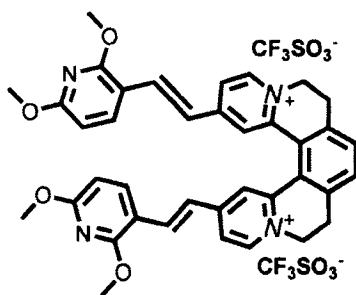


¹H NMR (400 MHz, acetonitril-d₃): 2,04 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 2,29–2,38 (m, 1H), 2,41–2,49 (m, 1H), 2,70 (tt, *J* = 5,9, 13,0 Hz, 1H), 3,03 (dd, *J* = 5,9, 13,8 Hz, 1H), 4,28 (td, *J* = 5,0, 14,1 Hz, 1H), 4,99 (dd, *J* = 5,6, 14,5 Hz, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,93 (dd, *J* = 1,3, 7,7 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 7,57–7,60 (m, 1H), 7,67–7,68 (m, 2H), 7,78 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,84–7,91 (m, 3H), 8,24 (dd, *J* = 1,0, 8,6 Hz, 1H).

Příklad 12

2,15-bis((*E*)-2-(2,6-dimethoxypyridin-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diiium trifluormethansulfonát, tj. PDA-C8-27

Výchozí racemický helquat K (30 mg, 49,0 μmol), 2,6-dimethoxynicotinaldehyd (245,6 mg, 1,47 mmol), piperidin (72 ml, 734,6 μmol) a suchý methanol (2 ml) byly dány do 10ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 6 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (30 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant byl oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (1 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (30 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k 35 mg (38,4 μmol, 78% výtěžek) žluté pevné látky PDA-C8-27.

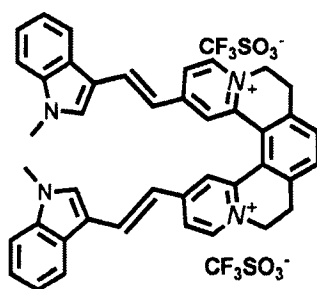


¹H NMR (400 MHz, acetonitril-d₃): 3,26–3,30 (m, 4H), 3,94 (s, 6H), 3,99 (s, 6H), 4,68–4,72 (m, 2H), 4,78–4,81 (m, 2H), 6,37 (d, *J* = 8,32 Hz, 2H), 7,04 (d, *J* = 16,32 Hz, 2H), 7,37 (d, *J* = 16,32 Hz, 2H), 7,68–7,71 (m, 4H), 7,85 (dd, *J*₁ = 1,93 Hz, *J*₂ = 6,64 Hz, 2H), 7,98 (d, *J* = 1,85 Hz, 2H), 8,60 (d, *J* = 6,64 Hz, 2H)

Příklad 13

2,15-bis((*E*)-2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)-6,7,10,11-tetrahydropyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDA-C10-13

Výchozí racemický helquat K (30 mg, 49,0 μmol), 1-methyl-1H-indol-3-karbaldehyd (233,9 mg, 1,47 mmol), piperidin (72 ml, 734,6 μmol) a suchý methanol (2 ml) byly dány do 10ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 6 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (30 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (1 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (30 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k zisku 37 mg (41,3 μmol, 84% výtěžek) tmavě červené pevné látky PDA-C10-13.



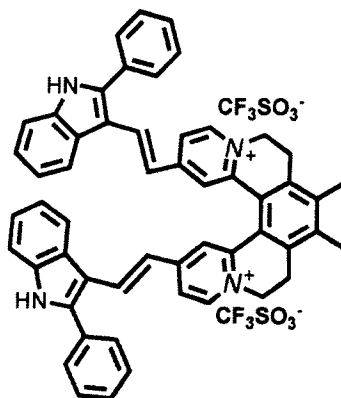
¹H NMR (400 MHz, acetonitril-d₃): 3,27–3,30 (m, 4H), 3,77 (s, 6H), 4,64–4,68 (m, 2H), 4,76–4,78 (m, 2H), 6,91 (d, *J* = 10,70 Hz, 2H), 7,20–7,23 (m, 2H), 7,29–7,32 (m, 2H), 7,43 (d, *J* = 5,47 Hz, 2H), 7,48 (s, 2H), 7,63 (d, *J* = 10,69 Hz, 2H), 7,68 (s, 2H), 7,80–7,83 (m, 4H), 7,92 (d, *J* = 1,3 Hz, 2H), 8,52 (d, *J* = 4,48 Hz, 2H).

Příklad 14

8,9-dimethyl-2a5-bis((*E*)-2-(2-fenyl-1H-indol-3-yl)vinyl)-6,7,10,11-tetrahydropyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. PDB-C15-8

Výchozí racemický helquat L (30 mg, 46,8 μmol), 2-fenyl-1H-indol-3-karbaldehyd (310,8 mg, 1,40 mmol), piperidin (69 ml, 702,4 μmol) a suchý methanol (2 ml) byly dány do 10ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 6 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monito-

rován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (30 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (1 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (30 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k získání 49 mg (46,8 μ mol, 81% výtěžek) tmavě červené pevné látky PDB-C15-8.

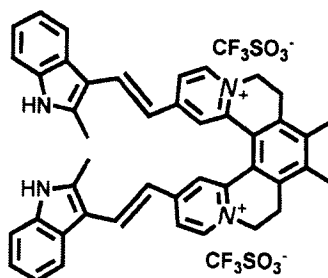


^1H NMR (400 MHz, acetonitril- d_3): 2,43 (s, 6H), 3,01–3,10 (m, 2H), 3,42–3,46 (m, 2H), 4,52–4,59 (m, 2H), 4,71–4,75 (m, 2H), 7,02 (d, J = 16 Hz, 2H), 7,18 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 7,28 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,46–7,62 (m, 14H), 7,68 (d, J = 1,49 Hz, 2H), 7,87 (d, J = 8 Hz, 2H), 8,20 (d, J = 6,68 Hz, 2H).

15 Příklad 15

8,9-dimethyl-2,15-bis((*E*)-2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-dium trifluormethansulfonát, tj. PDB-C10-11

Výchozí racemický helquat L (30 mg, 46,8 μ mol), 2-methyl-1H-indol-3-karbaldehyd (223,6 mg, 1,40 mmol), piperidin (69 ml, 702,4 μ mol) a suchý methanol (2 ml) byly dány do 10ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 6 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (30 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (1 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (30 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k získání 38 mg (41,2 μ mol, 88% výtěžek) tmavě červené pevné látky PDB-C10-11.



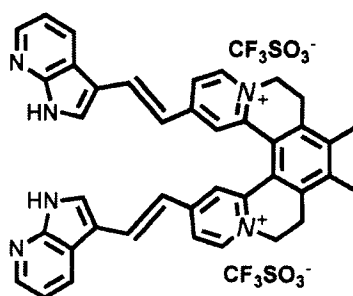
^1H NMR (400 MHz, acetonitril- d_3): 2,43 (s, 12H), 3,02–3,10 (m, 2H), 3,42–3,46 (m, 2H), 4,60–4,66 (m, 2H), 4,76–4,79 (m, 2H), 6,89 (d, J = 16 Hz, 2H), 7,12–7,19 (m, 4H), 7,36 (d, J = 8,16 Hz, 2H), 7,63 (d, J = 16 Hz, 2H), 7,78–7,85 (m, 6H), 8,46 (d, J = 6,74 Hz, 2H).

Příklad 16

5 2,15-bis((*E*)-2-(1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)-vinyl-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodi-
pyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diiium trifluormethansulfonát, tj. PDB-C8-14

10 Výchozí racemický helquat L (30 mg, 46,8 μ mol), 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-karbaldehyd
(205,3 mg, 1,40 mmol), piperidin (69 ml, 702,4 μ mol) a suchý methanol (2 ml) byly dány do
10ml baňky a výsledná směs míchána pod argonem 6 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl
10 monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním
diethyletheru (30 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný
podíl byl rozpuštěn v methanolu (1 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (30 ml).
Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové
pumpy vedlo k zisku 31 mg (34,6 μ mol, 74% výtěžek) žluté pevné látky PDB-C8-14.

15



20 ¹H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*₃): 2,45 (s, 6H), 3,05–3,12 (m, 1H), 3,42–3,49 (m, 2H), 4,62–
4,70 (m, 1H), 4,80–4,85 (m, 2H), 6,94 (d, *J* = 16,21 Hz, 2H), 7,17–7,20 (m, 2H), 7,60 (d, *J* =
16,21 Hz, 2H), 7,68–7,72 (m, 4H), 7,84 (dd, *J*₁ = 1,34 Hz, *J*₂ = 6,46 Hz, 2H), 8,20 (dd, *J*₁ =
1,26 Hz, *J*₂ = 8,03 Hz, 2H), 8,31–8,32 (m, 2H), 8,54 (d, *J* = 6,79 Hz, 2H).

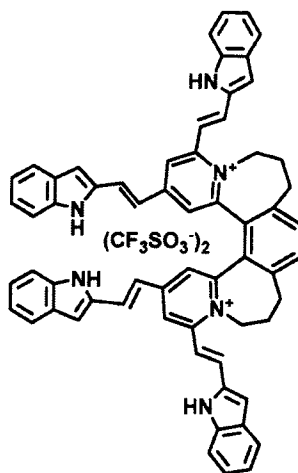
Příklad 17

25

(*rac*)-2,4,15,17-tetrakis((*E*)-2-(1*H*-indol-2-yl)-6,7,8,11,12,13-hexahydro-dipyrido[1,2-
a:1',2'-a']benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindiiium trifluormethansulfonát, tj. PRC-C9-11

30 Výchozí racemický helquat Q (10,0 mg, 14,9 μ mol), 1*H*-indol-2-karbaldehyd (138 mg,
957 μ mol), pyrrolidin (39 ml, 478 μ mol) a suchý methanol (0,5 ml) byly dány do 10 ml baňky
a výsledná směs míchána pod argonem 1 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován
tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyl-
etheru (5 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl
byl rozpuštěn v methanolu (0,5 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (5 ml). Stej-
ná procedura byla zopakována s tetrahydrofuranem (0,5 ml) – diethyletherem (5 ml) a acetonitri-
lem (0,3 ml) – diethyletherem (5 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysu-
šení pevného produktu na vakuu olejové pumpy vedlo k získání 12,9 mg (10,9 μ mol, 73% výtě-
žek) tmavě fialové pevné látky PRC-C9-11.

35



¹H NMR (400 MHz, dimethylsulfoxid-d₆): 2,31–2,35 (m, 1H), 2,52–2,53 (m, 1H), 2,67–2,78 (m, 1H), 3,11–3,13 (m, 1H), 4,55 (m, 1H), 5,00–5,03 (m, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,76 (d, *J* = 1,04 Hz, 1H), 6,866 (s, 1H), 6,97–7,04 (m, 1H), 7,08–7,12 (m, 1H), 7,146 (dd, *J* = 1,28, 8,32 Hz, 1H), 7,15–7,19 (m, 1H), 7,29–7,34 (m, 2H), 7,47 (d, *J* = 7,92 Hz, 1H), 7,53 (dd, *J* = 1,0, 8,96 Hz, 1H), 7,59–7,70 (m, 2H), 7,75 (d, *J* = 16,92 Hz, 1H), 7,82 (d, *J* = 9,72 Hz, 1H), 8,18 (d, *J* = 15,52 Hz, 1H), 8,58 (d, *J* = 1,84 Hz, 1H), 11,61 (s, 1H for–NH), 11,90 (s, 1H for–NH).

10

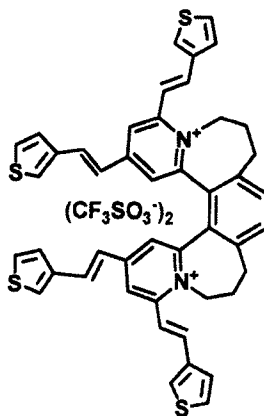
Příklad 18

(*rac*)-2,4,13,15-tetrakis(*E*)-2-(thiophen-3-yl)vinyl)-6,7,8,11,12,13-hexahydro-dipyrido[1,2-a;1',2'-a']benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindium trifluormethansulfonát, tj. PRC-C5-9

15

Výchozí racemický helquat Q (10,0 mg, 14,9 μmol), thiofen-3-karbaldehyd (107 mg, 957 μmol), pyrrolidin (39 ml, 478 μmol) a suchý methanol (0,5 ml) byly dány do 10ml baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 5 min za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (5 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (0,5 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (5 ml). Stejná procedura byla zopakována s tetrahydrofuranem (0,5 ml) – diethyletherem (5 ml) a acetonitrilem (0,3 ml) – diethyletherem (5 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vysušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy poskytlo 13,1 mg (12,5 μmol, 84% výtěžek) žluté pevné látky PRC-C5-9.

25



¹H NMR (400 MHz, acetonitril-d₃): 2,32–3,38 (m, 1H), 2,45–2,54 (m, 1H), 2,67–2,72 (m, 1H), 3,01–3,06 (dd, *J* = 6,44, 14,04 Hz, 1H), 4,24–4,32 (td, *J* = 5,32, 14,04 Hz, 1H), 5,013 (dd, *J* =

30

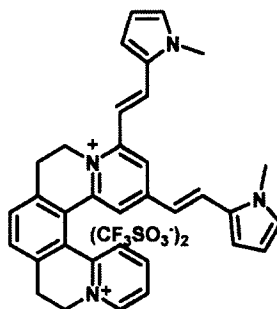
5,72, 14,68 Hz, 1H), 6,97 (d, $J = 16,28$ Hz, 1H), 6,98 (d, $J = 1,96$ Hz, 1H), 7,316 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 7,37 (dd, $J = 1,28, 5,16$ Hz, 1H), 7,48 (dd, $J = 2,80, 5,08$, 1H), 7,60 (dd, $J = 2,88, 5,16$ Hz, 1H), 7,65–7,71 (m, 4H), 7,83 (d, $J = 15,76$ Hz, 1H), 7,88 (dd, $J = 1,24, 2,88$ Hz, 1H), 8,24 (d, $J = 2,04$, 1H).

5

Příklad 19

10 (*rac*)-2,4-bis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydro-dipyrido[2,1-
a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. HTA-C6-4

Výchozí racemický helquat O (10,0 mg, 16,3 μ mol), 1-methyl-1*H*-pyrrol-2-karbaldehyd (57 mg, 522 μ mol), pyrrolidin (22 ml, 261 μ mol) a suchý methanol (0,5 ml) byly dány do 10ml
15 baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 1 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (5 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (0,5 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (5 ml). Stejná procedura byla zopakována s tetrahydrofuranem (0,5 ml) – diethyletherem (5 ml) a acetonitrilem (0,3 ml) – diethyletherem (5 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vy-
20 sušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy poskytlo 10,1 mg (12,7 μ mol, 78% výtěžek) oranžové pevné látky HTA-C6-4.



25 ^1H NMR (400 MHz, acetonitril- d_3): 3,08–3,33 (m, 4H), 3,68 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 4,22–4,26 (m, 1H), 4,89–4,90 (m, 2H), 5,02–5,05 (m, 1H), 6,17–6,19 (m, 1H), 6,26–6,28 (m, 1H), 6,73 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H), 6,71 (t, 1,6 Hz, 1H), 6,91 (t, $J = 2,04$ Hz, 1H), 6,98–7,00 (m, 2H), 7,13 (d, $J = 15,56$ Hz, 1H), 7,37 (d, $J = 15,96$ Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 1,96$, 1H), 7,16–7,71 (m, 3H), 7,85 (td, $J = 1,44, 2,96, 7,64$ Hz, 1H), 7,99 (dd, $J = 1,4, 8,48$ Hz, 1H), 8,08 (d, $J = 1,96$ Hz, 1H), 8,15 (td, $J = 1,48, 1,92, 8,48$, 1H), 8,78 (dd, $J = 1,36, 5,68/7,16$ Hz, 1H).

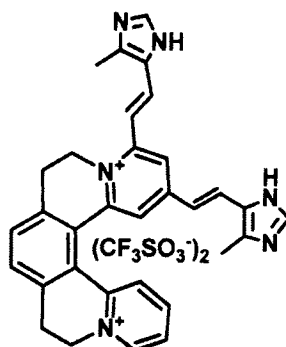
30

Příklad 20

35 (*rac*)-2,4-bis((*E*)-2-(4-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydro-dipyrido[2,1-
a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát, tj. HTA-C5-11

Výchozí racemický helquat O (10,0 mg, 16,3 μ mol), 1-methyl-1*H*-pyrrol-2-karbaldehyd (57 mg, 522 μ mol), pyrrolidin (22 ml, 261 μ mol) a suchý methanol (0,5 ml) byly dány do 10ml
40 baňky a výsledná směs byla míchána pod argonem 1 h za laboratorní teploty. Postup reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (5 ml). Suspenze byla odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu. Pevný podíl byl rozpuštěn v methanolu (0,5 ml) a čistý produkt vysrážen přidáním diethyletheru (5 ml). Stejná procedura byla zopakována s tetrahydrofuranem (0,5 ml) – diethyletherem (5 ml) a acetonitrilem (0,3 ml) – diethyletherem (5 ml). Odstředění této suspenze, odstranění supernatantu a vy-
45 sušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy poskytlo 10,1 mg (12,7 μ mol, 78% výtěžek) oranžové pevné látky HTA-C5-11.

sušení pevného produktu na vakuu olejové pumpy poskytlo 10,1 mg (12,7 μmol , 78% výtěžek) tmavě žluté pevné látky HTA-C5-11.



5

^1H NMR (400 MHz, acetonitril- d_3): 2,32 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 3,12–3,43 (m, 4H), 4,27–4,31 (m, 1H), 4,80–4,88 (m, 2H), 5,05 (m, 1H), 7,01 (d, $J = 16,04$ Hz, 1H), 7,44–7,52 (m, 4H), 7,62–7,76 (m, 4H), 7,83–7,96 (m, 2H), 8,13–8,17 (m, 1H), 8,026 (d, $J = 1,96$ Hz, 1H), 8,77 (dd, $J = 2,12, 6,32$ Hz, 1H), 10,38 (broad s, 2H for $-\text{NH}$).

10

Příklad 21

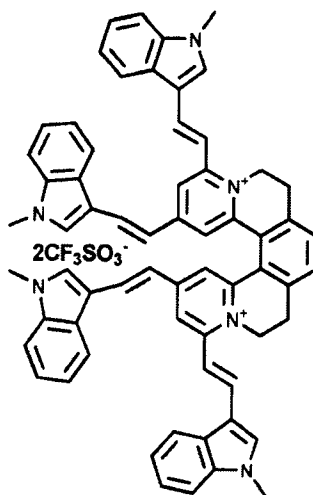
2,4,13,15-tetrakis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodiprido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diiium trifluormethansulfonát, tj. TKA-C10-13

15

Výchozí helquat P (10 mg, 15,6 μmol), 1-methyl-1*H*-indol-3-karbaldehyd (149,1 mg, 936,6 μmol), pyrrolidin (41 μl , 499,5 μmol) a suchý methanol (0,5 ml) byly umístěny do vialky se šroubovacím uzávěrem o objemu 10 ml a směs byla míchána pod argonem po dobu 45 min za teploty místnosti. Postup reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie. Surový produkt byl vysrážen z reakční směsi přidáním diethyletheru (5 ml). Suspenze byla odstředěna a kapalný podíl oddělen od pevné látky. Pevný podíl byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (0,3 ml) a produkt vysrážen přidáním diethyletheru (5 ml). Následovalo odstředění této suspenze a odstranění kapalného podílu. Tato procedura byla opakována ještě třikrát za použití methanolu (0,5 ml) místo tetrahydrofuranu a poté ještě dvakrát jenom s diethyletherem (5 ml). Následovalo vysušení pevného produktu pod vakuem za použití olejové pumpy. Takto bylo získáno 12,3 mg (10,2 μmol , 65% výtěžek) temně červené pevné látky TKA-C10-13.

20

25



30

¹H NMR (400 MHz, dimethylsulfoxid-d₆): 3,23–3,41 (m, 4H), 3,72 (s, 6H), 3,97 (s, 6H), 4,54 (t, $J = 12,4$; 12,4 Hz, 2H), 5,24 (d, $J = 11,1$ Hz, 2H), 6,93 (dd, $J = 15,1$; 0,1 Hz, 2H), 6,95 (d, $J = 16,2$ Hz, 2H), 7,13 (ddd, $J = 8,2$; 7,2; 1,1 Hz, 2H), 7,33–7,42 (m, 4H), 7,45 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,53 (d, $J = 16,7$ Hz, 2H), 7,65–7,70 (m, 6H), 7,77–7,79 (m, 4H), 8,07 (d, $J = 1,8$ Hz, 2H), 8,19–8,23 (m, 6H), 8,30 (d, $J = 1,9$ Hz, 2H).

Metody biologické charakterizace látek

Kvantifikace míry interakce helquatů s G–kvadruplexy v modelových oligonukleotidech pomocí metody FRET

Pro zjištění míry *in vitro* interakce helquatů s G–kvadruplexem byly použity oligonukleotidy obsahující na guanin bohaté sekvence lidské telomery (F21T) a NHE III₁ oblasti promotoru onkogenu *c-myc* (Fmyc27T). Oba oligonukleotidy schopné tvorby intramolekulárního G–kvadruplexu byly na koncích značené vhodnými fluorofory tak, aby vznikl donor–akceptorový FRET pár (5′–FAM a 3′–TAMRA). Pokud je oligonukleotid sbalen do struktury G–kvadruplexu, donor se nachází v blízkosti akceptoru a dochází k nezářivému přenosu energie na akceptor. S rostoucí teplotou reakční směsi dochází k postupné denaturaci struktury G–kvadruplexu a tím i vzdalování donoru a akceptoru (FAM–TAMRA). Dochází tak k růstu fluorescence donoru (FAM) a poklesu fluorescence akceptoru (TAMRA). Výsledkem měření je křivka intenzity fluorescence donoru v závislosti na teplotě. Pokud je G–kvadruplex stabilizován ligandem, dojde ke zvýšení teploty tání. Teplota tání G–kvadruplexu odpovídá teplotě, kdy je denaturováno 50% původního množství sbaleného G–kvadruplexu. Výsledkem měření je stanovení rozdílu teplot tání (ΔT_m) samotného G–kvadruplexu a G–kvadruplexu stabilizovaného ligandem. Experimenty byly prováděny v 10 mmol.l⁻¹ kakodylátovém pufru (pH=7,2) s 5 mmol.l⁻¹ KCl a 95 mmol.l⁻¹ LiCl v případě oligonukleotidu Fmyc27T a v 10 mmol.l⁻¹ kakodylátovém pufru (pH=7,2) s 25 mmol.l⁻¹ KCl a 75 mmol.l⁻¹ LiCl v případě oligonukleotidu F21T. Oba oligonukleotidy byly denaturovány 5 minut při 95 °C a následně ponechány ve vypnutém termobloku až do vychladnutí na teplotu místnosti (3 hodiny). Finální koncentrace oligonukleotidu v reakční směsi byla 0,2 μmol.l⁻¹. Testované helquaty byly přítomny v koncentraci 1 μmol.l⁻¹. Celkový objem reakční směsi byl 30 μl. Teplota tání samotných oligonukleotidů (bez přítomnosti helquatů) byl za těchto podmínek 58,1 ± 0,2 °C pro F21T a 64,7 ± 0,4 °C pro Fmyc27T. Pro stanovení selektivity vazby helquatů na G–kvadruplex ve srovnání s dvouvláknovou DNA se do reakce přidával 50násobný nadbytek dvouvláknové DNA (10 mmol.l⁻¹ neznačený kompetitor ds26 tvořící vlásenku). Po přidavku do reakční směsi soutěží ds26 se značeným oligonukleotidem (Fmyc27T, či F21T) o vazbu ligandu. Pokud je testovaný ligand selektivní vůči G–kvadruplexu nedojde v přítomnosti kompetitoru ds26 k poklesu ΔT_m oproti ΔT_m měřené bez ds26 kompetitoru. Teplota tání samotných oligonukleotidu v přítomnosti kompetitoru je 59,4 ± 0,5 °C pro F21T a 66,3 ± 0,6 °C pro Fmyc27T.

Fluorescence donoru FAM byla měřena pomocí real–time PCR přístroje Opticon 2 (excitace 470 až 505 nm a emise 523 až 543 nm) v teplotních krocích 0,5 a v rozmezí 25 až 95 °C. Vyhodnocení sigmoidních křivek intenzity fluorescence v závislosti na teplotě bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA). Pomocí nelineární pěti parametrické regrese byl vypočítán inflexní bod křivky, který odpovídá teplotě tání (T_m) G–kvadruplexu za daných podmínek. Uvedené hodnoty byly získány z nejméně tří nezávislých měření.

ds26: 5′–CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG–3′

F21T: 5′–FAM–GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG–TAMRA–3′

Fmyc27T: 5′–FAM–TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG–TAMRA–3′

Tabulka 1: Změna teploty tání G–kvadruplexu oligonukleotidu Fmyc27T v přítomnosti různých ligandů; hodnoty určeny metodou FRET

označení látky	ΔT_m (° C) Fmyc27T	SD Fmyc27T	ΔT_m (° C) Fmyc27T/ds26 (° C)	SD Fmyc27T/ds26
LSA-C9-30	10,5	0,4	8,2	0,4
LSA-C9-32	10,4	0,5	8,1	0,2
MJA-C13-8	11,0	1,1	4,9	1,2
MJB-C8-27	9,7	1,0	10,0	1,3
MSB-C13-8	12,6	0,2	7,7	0,9
PDA-C10-11	14,9	0,4	13,9	0,7
PDA-C10-13	13,8	0,9	13,6	1,1
PDA-C15-8	18,8	1,3	19,9	0,4
PDA-C8-27	11,8	0,6	9,6	0,3
PDA-C9-30	14,6	0,8	16,0	1,1
PDB-C10-11	14,2	0,9	13,1	1,1
PDB-C15-8	15,7	1,5	14,5	1,3
PDB-C8-14	11,5	0,7	9,3	0,7
PRA-C12-5	11,3	0,2	8,6	0,5

5

Tabulka 2: Změna teploty tání G–kvadruplexu oligonukleotidu F21T v přítomnosti různých ligandů; hodnoty určeny metodou FRET

10

označení látky	ΔT_m (° C) F21T	SD F21T	ΔT_m (° C) F21T/ds26	SD F21T/ds26
PDA-C10-11	12,9	0,2	12,3	0,4
PDA-C10-13	9,7	1,2	9,1	0,3
PDA-C15-8	17,2	1,2	17,3	1,0
PDA-C9-30	12,3	2,0	13,1	2,0
PDB-C10-11	13,0	0,8	10,7	1,0
PDB-C15-8	11,3	1,2	11,1	1,2
PDB-C8-14	8,4	1,0	5,0	0,1
LSA-C9-30	8,6	0,4	5,5	0,9
LSA-C9-32	9,3	0,1	6,6	0,2
MJA-C13-8	7,4	0,1	1,4	1,0
MJB-C8-27	8,0	0,8	5,2	0,8
MSB-C13-8	9,0	0,3	3,4	0,3
PDA-C8-27	9,3	0,5	7,0	0,6
PRA-C12-5	8,8	0,3	5,4	0,7

Hodnoty teplot tání *c-myc* promotorového (Fmyc27T) a telomerického (F21T) G–kvadruplexu (tab. 1 a tab. 2) ukazují na nečekaně významnou schopnost testovaných látek stabilizovat tyto

struktury. Zároveň helquaty mají výrazně vyšší selektivitu vůči G–kvadruplexům ve srovnání s dvouvláknovou DNA než pozitivní kontrola TMPyP4.

5 Kvantifikace míry interakce helquatů s G–kvadruplexem v modelových oligonukleotidech pomocí metody ECD

Spektrometr ECD

10 Spektra ECD byla měřena na spektrometru J–815 (Jasco, Japan). Nastavení parametrů měření (tab. 3), ukládání spekter a odečítání pozadí bylo prováděno v programu Spectra Manager (Jasco, Japan).

15 Tabulka 3: Nastavení parametrů pro měření spekter ECD a křivky tání měřené pro zvolenou vlnovou délku

Parametr	Nastavení	
	spektrum	křivka tání
počátek	800 nm	25 °C
konec	210 nm	95 °C
šířka pásu	1 nm	1 nm
odpověď	1 s	1 s
citlivost	standard	standard
přírůstek	1 nm	1 °C
rychlost skenu	200 nm min ⁻¹	–
akumulace	5	–
monitorovaná vlnová délka	–	263 nm
nárůst teploty	–	1 °C.min ⁻¹

20 Pro měření teplotních závislostí byly kyvety v kyvetovém prostoru umístěny do Peltierova nástavce, teplota byla řízena programem Spectra Manager. Křivky tání byly měřeny při vlnové délce, která odpovídala maximálnímu rozdílu intenzity signálu ECD spektra oligonukleotidu při teplotě 25 a 95 °C, jak je ukázáno na obr. 1. Před i po měření křivek tání byla změřena spektra ECD v krajních teplotách, aby byla ověřena stabilita studovaného systému.

25 Zpracování ECD spekter

30 Zpracování spekter bylo provedeno pomocí programu Spectra Manager (Jasco, Japonsko). Výsledná spektra byla získána tak, že od naměřeného spektra vzorku bylo odečteno spektrum pozadí, kterým bylo spektrum rozpouštědla. Měření spektra vzorku a pozadí probíhala za identických podmínek. Spektra ECD jsou uváděna jako elipticita, značená v obrázcích CD [mdeg], jejíž číselná hodnota souvisí s bezrozměrným cirkulárním dichroismem ΔA ($CD_v = 32980 \Delta A_v$). Toto značení CD zachovává zvyklosti mezinárodních časopisů, v nichž jsou publikovány články z oboru.

35 Roztoky oligonukleotidu

40 Z oligonukleotidu c–Myc27 byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ rozpuštěním v H₂O. Kyveta o tloušťce 1 mm byla plněna 7 μl roztoku oligonukleotidu a 133 μl Li⁺–kakodylátového pufru. Roztok oligonukleotidu byl v kyvetě převrstven minerálním olejem, aby se při

měření teplotních závislostí omezily koncentrační změny způsobené odpařováním rozpouštědla při vyšších teplotách.

c-Myc27: 5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-3'

5

Roztoky ligandu

Ze zásobních roztoků racemických směsí ligandu v DMSO o koncentraci 10 mmol l⁻¹ byly připraveny roztoky o koncentraci 140 μmol l⁻¹ rozpuštěním v H₂O. Ligandy byly přidávány do roztoku oligonukleotidu pod rozhraní pufr/minerální olej mikrostríkačkou Hamilton (5 μl roztoku o koncentraci 140 μmol l⁻¹). Výsledný molární poměr oligonukleotid ligand byl 1:1.

10

Postup měření

Kyveta naplněná roztokem oligonukleotidu c-Myc27 v Li⁺-kakodylátovém pufru (c_{c-Myc27} = 5 μmol l⁻¹) byla nejprve ohřátá 5 minut na 95 °C, při této teplotě bylo změřeno spektrum ECD. Poté byl vzorek ochlazen na 25 °C, ponechán 10 min ke stabilizaci a poté bylo opět změřeno spektrum ECD. Poté byla změřena křivka tání ECD oligonukleotidu při 263 nm v rozmezí teplot 25 až 95 °C a pro ověření stability vzorku byla opět změřena spektra při 95 a 25 °C. Pod olejovou vrstvou byl k roztoku oligonukleotidu přidán roztok ligandu (c_{ligand} = 5 μmol l⁻¹), vzorek byl důkladně promíchán a bylo změřeno spektrum ECD při 25 °C, křivka tání a opět kontrolní spektra při 95 a 25 °C.

20

Výsledky

25

Na obr. 1 jsou spektra ECD oligonukleotidu c-Myc27 v Li⁺-kakodylátovém pufru (c_{c-Myc27} = 5 μmol l⁻¹) při teplotách 25 a 95 °C. Při teplotě 25 °C byly pozorovány pásy u 210(+), 240(-) a 263(+). Tento spektrální průběh odpovídá paralelní konformaci G-kvadruplexu [Vorlickova M. a spol. (2012) *Methods*, 57, 64; Sun, D. a spol. (2010) *Methods in molecular biology*, 608, 65; Yang D. a spol. (2010) *Future Med. Chem.*, 2, 619]. Na základě podobnosti spekter ECD by se nabízelo, že i při teplotě 95 °C roztok obsahuje strukturu paralelně uspořádaného G-kvadruplexu. Po změření křivky tání (sigmoidální průběh, obr. 2) však bylo evidentní, že s rostoucí teplotou došlo k rozložení G-kvadruplexu. Zachování tvaru signálu ECD, zejména přítomnost pásu u 263 nm odpovídá interakci sousedních bází v řetězci oligonukleotidu [Kypr J. a spol. (2002) *Biopolymers*, 67, 275; Kypr J. a spol. (2007) *Biopolymers*, 87, 218; Kejnovska I. a spol. (2007) *Biopolymers*, 85, 19].

30

35

Interakce G-kvadruplex/ligand: teplotní experiment

Rozklad struktury G-kvadruplexu v přítomnosti ligandu vlivem teploty byl sledován při vlnové délce, která odpovídala maximálnímu rozdílu intenzit signálů ECD systému oligonukleotid/ligand při teplotách 25 a 95 °C, tj. při 263 nm. Teplotní stabilita G-kvadruplexu byla sledována v rozmezí 25 až 95 °C, a to v molárním poměru oligonukleotid ligand = 1:1. Příklad vlivu studovaného ligandu na stabilitu G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem c-Myc27 je znázorněn na obr. 2. Tento obrázek ukazuje zvýšení teploty tání G-kvadruplexu v přítomnosti ligandu PDB-C10-11.

45

Za míru stabilizace G-kvadruplexu byla zvolena změna teploty tání G-kvadruplexu způsobená přítomností ligandu (ΔT_m):

50

$$\Delta T_m = T_{m, \text{oligonukleotid ligand}} - T_{m, \text{oligonukleotid}} \quad (1),$$

kde $T_{m,oligonukleotid\ ligand}$ je teplota tání molekulárního systému tvořeného oligonukleotidem a ligandem a $T_{m,oligonukleotid}$ je teplota tání samotného oligonukleotidu. V tab. 4 jsou shrnuty změny teploty tání G–kvadruplexu oligonukleotidu c–Myc27 v přítomnosti studovaných ligandů.

5

Tabulka 4: Změna teploty tání G–kvadruplexu oligonukleotidu c–Myc27 v přítomnosti různých ligandů; hodnoty určeny metodou ECD

označení látky	ΔT_m (°C)
MJA-C13-8	6,8
PDB-C10-11	9,8
PDB-C8-14	5,0
PDA-C15-8	10,1
LSA-C9-30	6,4
PDA-C10-11	8,2

10

Výsledky této části studie ukazují, že helquaty způsobují překvapivě vysokou míru stabilizace G–kvadruplexu. Tyto výsledky také dokumentují citlivost spektroskopie ECD k sekundárním strukturám oligonukleotidu a ukazují, že pomocí měření křivek tání ECD lze charakterizovat stabilizační schopnosti ligandů vůči struktuře G–kvadruplexu.

15

Stabilizace G–kvadruplexu promotorové oblasti *c–myc* genu

K stanovení míry stabilizace G–kvadruplexu v promotorové oblasti *c–myc* genu na buněčné úrovni byla využita duální luciferázová analýza. Stabilizace G–kvadruplexu je vyjádřena poměrem exprese dvou luciferáz (*firefly* a *Renilla*) z kotransfekovaných vektorů pGL4.10–myc (*luc2*) a pRL–TK (*Renilla*) do buněčné linie HGC–27 exprimující *c–myc* protein. Expresse reportérového genu (*firefly* luciferázy) z pGL4.10–myc vektoru je řízena *c–myc* regulační oblastí o délce 860 bp (v rozsahu od –306 do +554). Tato vložená sekvence obsahuje NHE III₁ segment, který tvoří G–kvadruplex [Yang D. a spol. (2010), *Future Med Chem.*, 2, 619] a je zodpovědný až za 25 90% transkripční aktivity *c–myc* genu.

Míra exprese *firefly* luciferázy, reportérového genu, tak odpovídá aktivitě promotoru *c–myc* a tím i míře stabilizace G–kvadruplexu. Signál je normalizován na expresi *Renilla* luciferázy z pRL–TK vektoru, která je pod kontrolou konstitutivního virového thymidin kinázového (HSV–TK) promotoru. Míra exprese *Renilla* luciferázy slouží jako vnitřní kontrola pro normalizaci *firefly* signálu na účinnost transfekce v měřeném vzorku.

Plasmidy pGL4.10–myc (*luc2*) a pRL–TK byly namnoženy v bakterii *Escherichia coli* (kmen DH5 α) a purifikovány pomocí Qiagen Plasmid Mini a Midi kitu. Buňky byly kultivovány za standardních podmínek a v exponenciální fázi růstu byly vysazeny do bílých 96–jamkových mikrotitračních destiček. Transfekce byla provedena pomocí transfekčního činidla X–tremeGENE HP DNA v médiu OptiMEM po dobu dvou hodin. Poměr reportérového a kontrolního vektoru byl 1:1 a transfekčního činidla k celkovému množství DNA byl 1:1.2 hodiny po transfekci byly přidány helquaty v koncentraci 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Množství *firefly* a *Renilla* luciferázy v jednotlivých vzorcích bylo stanoveno 24 hodin po transfekci. Duální luciferázová analýza byla prováděna pomocí komerčně dostupného kitu (Promega, kat. č. E1960) podle instrukcí od výrobce. Luminiscence byla měřena pomocí luminometru EnSpire Alpha Plate Reader. Získaná data byla normalizována na signál *Renilla* luciferázy a poté byly hodnoty vztaženy ke kontrole. Výsledky stabilizace G–kvadruplexu a inhibice exprese *firefly* luciferázy jsou shrnuty v tabulce 5. Tabulka 6 uvádí koncentrační závislosti pro dva vybrané helquaty (MJA–C13–8 a VDJA–C13–6).

45

Tabulka 5: Výsledky inhibiční studie exprese luciferázy v luciferázové duální analýze s plasmidem pGL4.10-myc (*luc2*) při koncentraci helquatů 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ vztážené ke kontrole (kontrola = 100%)

5

označení látky	50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ [%]
VDJA-C13-6	27
VDJA-C13-8	76
LSA-C13-8	58
MJA-C9-30	55
MSC-C10-11	74
MSC-C9-30	68
MJA-C13-8	56
MJB-C5-9	75
MSC-C9-10	56
MJB-C5-3	65
LSA-C9-32	74
HTA-C5-9	85
MJA-C8-28	72
MSC-C15-8	76
MJB-C8-27	88
MSC-C13-16	85
MSC-C10-10	85
PRA-C12-5	86
PDA-C8-27	77

- 10 Tabulka 6: Koncentrační závislosti inhibice exprese luciferázy v luciferázové duální analýze s plasmidem pGL4.10-myc (*luc2*) pro helquaty MJA-C13-8 a VDJA-C13-6 vztážené ke kontrole (kontrola = 100%)

označení látky	Koncentrace $\mu\text{mol.l}^{-1}$	% exprese vzhledem ke kontrole
MJA-C13-8	10	79,3 \pm 6,7
	50	69,8 \pm 6,0
	150	57,9 \pm 2,5
VDJA-C13-6	10	59,0 \pm 17,9
	50	27,1 \pm 0,8
	150	15,3 \pm 2,9

15

Imunodetekce proteinu c-myc

- 20 Stanovení změny exprese proteinu (transkripčního faktoru) c-myc v buněčných lyzátech připravených z nádorové buněčné linie HGC-27 po ovlivnění testovanými helquaty (tab. 7) bylo provedeno imunodetekcí po separaci proteinů dle jejich velikosti pomocí gelové elektroforézy (SDS-PAGE) a jejich přenosu na membránu.

Pro zjištění vlivu helquatů na expresi c-myc proteinu byly buňky kultivovány za standardních podmínek a v exponenciální fázi růstu byly vysazeny do kultivačních lahví v hustotě 25 000 buněk/cm². Další den byly přidány vybrané helquaty o koncentraci 50 μmol.l⁻¹. Po 24 hodinové inkubaci byly získány buněčné pelety a po přidání RIPA pufru s inhibitory proteáz (PrlC) a fosfatáz (PhIC) (složení viz tab. 8) byly připraveny buněčné lyzáty. Na 10⁷ buněk bylo použito 150 μl RIPA pufru. Koncentrace proteinů v lyzátech byla změřena pomocí BCA metody. Separace proteinů v lyzátech proběhla na 12% denaturačním polyakrylamidovém gelu. Rozdělené proteiny byly přeneseny na PVDF membránu metodou Western blot. Inkubace s primární monoklonální myší protilátkou proti proteinu c-myc (ředění 1:1000 v "SignalBoost" činidlo) probíhala přes noc při 4 °C, a poté s primární myší protilátkou proti β-aktinu (ředění 1:5000 v 5% mléce v TBS-T pufru) při laboratorní teplotě 2 hodiny. Následně byla použita sekundární koňská monoklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředěna 1:2000 v 5% mléce v TBS-T pufru) vázající se na myší protilátky typu IgG. Proteiny c-myc a β-aktin navázané na membráně byly vizualizovány pomocí detekčního kitu (SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrát, kat.č. 34095, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) snímáním chemiluminiscence v detekčním systému ImageQuant LAS 4000 Mini (kat.č. 28-9558-13, GE Healthcare Life Sciences, USA). Množství proteinu bylo kvantifikováno denzitometricky v programu Quantity One. Množství c-myc v jednotlivých vzorcích bylo normalizováno k P-aktinu a následně vztaženo ke kontrolnímu vzorku.

Tabulka 7: Testované helquaty; výsledky inhibice exprese proteinu c-myc vůči kontrole (kontrola = 100 %) při celkové koncentraci 50 μmol.l⁻¹

označení látky	50 μmol.l ⁻¹ [%]
MSC-C9-30	14
LSA-C13-8	15
MJB-C5-11	23
MJA-C8-28	23
LSA-C9-16	28
MJB-C5-9	30
MSC-C9-18	31
HTA-C9-16	32
PRC-C5-9	34
MSC-C9-16	36
HTA-C9-17	44
MJA-C13-8	58
MSC-C15-8	58
MJA-C11-25	66
PRC-C10-10	71
HTA-C10-10	75
VDJA-C13-8	77
PDA-C5-11	80
MJA-C19-4	81
PDB-C13-8	83
MSC-C10-36	85

Tabulka 8: Složení lyzačního pufru

RIPA pufr:
50 mmol.l ⁻¹ TRIS-HCl
1% Nonidet-40
150 mmol.l ⁻¹ NaCl
0,5% deoxycholát sodný
0,1% SDS
inhibitor proteázy a fosfatázy:
PrIC 2,5 µl/100 µl RIPA pufru
PhIC 1 µl/100 µl RIPA pufru

5

Stanovení viability pomocí XTT testu

Vliv testovaných látek na viabilitu (proliferaci) použitých buněčných linií byl zkoumán v koncentracích 0 až 100 mmol.l⁻¹.

10

Charakterizace použitých buněčných linií

Pro zhodnocení antiproliferačních účinků testovaných látek *in vitro* byla použita nádorová buněčná linie CCRF–CEM odvozená od akutní lymfoblastické leukémie a normální (zdravá) buněčná linie HUVEC endoteliálních buněk z umbilikální vény. Obě uvedené buněčné linie byly kultivovány za podmínek optimálních pro jejich růst v příslušném médiu v plastových lahvích nebo plastových Petriho miskách o různé velikosti (TPP, BD Biosciences) při 37 °C, 5% CO₂ a 95% vzdušné vlhkosti. Buňky HUVEC byly získány od BD Biosciences. CCRF–CEM buněčná linie byla získána z ATCC/LGC Standards (American Type Cell Collection).

20

CCRF–CEM (kat. č. ATCC CCL–119)

Suspenzní buněčná linie CCRF–CEM je permanentní *in vitro* kultura akutní lymfoblastické leukémie. Linie CCRF–CEM byla kultivována v RPMI 1640 médiu (Sigma–Aldrich, kat. č. R8758) s přidavkem 2 mmol.l⁻¹ glutaminu (Invitrogen, kat. č. 35050–038), 10% fetálního hovězího séra (FBS, Sigma–Aldrich, kat. č. F9665), 100 IU/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu (Sigma–Aldrich, kat. č. P0781). Pasážování probíhalo 2 až 3x týdně. Doba zdvojení populace CCRF–CEM za použitých kultivačních podmínek je 20 hodin.

30

HUVEC (BD Biosciences, kat. č. 354151)

Normální lidské endoteliální buňky z umbilikální vény jsou adherentní buňky, které byly kultivované v plastových Petriho miskách potažených kolagenem I. Do kultivačního média (E–STIM™; BD Biosciences, kat. č. 355054) již obsahujícího 2% FBS (fetální bovinní sérum), hydrokortizon a heparin byl dále přidán epidermální růstový faktor (EGF, 5 mg) a směs faktorů podporujících růst endoteliálních buněk (ECGS, 100 mg). Použité kultivační médium neobsahovalo antibiotika. Buňky byly pasážovány po dosažení 90% monovrstvy uvolněním inkubací s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (1 ml; 3 min; 37 °C). Poté bylo přidáno 5 ml kompletního kultivačního média E–STIM™ a buňky byly odstředěny (180 x g, 7 min), resuspendovány a přeneseny v požadovaném množství do nové Petriho misky s čerstvým médiem. V experimentech byly používány buňky mezi pasážemi 3 a 8 po rozmražení. Doba zdvojení populace HUVEC za použitých kultivačních podmínek je 38 hodin.

40

Zhodnocení viability nádorových a normálních buněk po působení různých koncentrací testovaných látek

5 Při testování citlivosti buněčných linií na studované helquaty byl použit XTT cytotoxicitní/pro-
liferiční test pro stanovení buněčné viability. Tato metoda je založena na schopnosti metabolicky
aktivních buněk redukovat žlutou tetrazoliovou sůl XTT na oranžový formazan. Míra této přemě-
ny je měřena jako nárůst absorpance při 492 nm a je úměrná enzymatické aktivitě mitochondriál-
ních dehydrogenáz a tedy i počtu metabolicky aktivních (viabilních) buněk. Výstupem je hodnota
10 IC₅₀, která odpovídá koncentraci testované látky, působící pokles počtu viabilních buněk na
polovinu (tj. 50% zpomalení dělení buněk) vzhledem ke kontrolní, neovlivněné populaci. Odráží
tedy účinnost testované látky vzhledem k dané buněčné linii.

15 Buňky v exponenciální fázi růstu byly vysety na 96-jamkovou mikrotitrační destičku v koncent-
raci 3000 buněk na jamku. Každá jamka obsahovala 90 μl buněčné suspenze. Následující den
bylo přidáno vždy po 10 μl 10 x koncentrovaných testovaných látek. Účinek helquatů byl zkou-
mán v rozsahu koncentrací 1 až 100 μmol.l⁻¹ (popřípadě 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 25; 50
a 100 μmol.l⁻¹). Kromě části obsahující uvedenou koncentrační řadu zkoumaných látek byly na
20 destičce vždy přítomny 2 kontrolní sloupce, první s čistým médiem (tzv. blank) a druhý s buňka-
mi v médiu bez testovaných látek (kontrola). Do kontroly i blanku byl přidán objem rozpouštědla
(vody) totožný s objemem přidávaných látek. Po 72 hodinách působení látek bylo provedeno
stanovení viability dle návodu výrobce. Ve stručnosti: Do každé jamky 96-jamkové mikrotitrační
destičky bylo přidáno 50 μl připraveného pracovního roztoku XTT (detekčního činidla) a poté
25 byla mikrotitrační destička vrácena do CO₂ inkubátoru. Po 2 hodinách byla změřena v každé
jamce absorpance při 492 nm (referenční vlnová délka 690 nm) pomocí multifunkčního readeru
(Tecan Genios, Rakousko).

Pracovní roztok XTT byl připraven smícháním 5 ml XTT reagensu a 100 μl roztoku PMS. Přípra-
va obou složek je uvedena níže:

30

XTT reagens

35 Roztok XTT byl připraven rozpuštěním 500 mg sodné soli XTT (Sigma–Aldrich, kat. č. X4626)
v 500 ml RPMI–1640 média (Sigma–Aldrich, kat. č. R7509) a následném ohřevu 10 min při
60 °C. Z takto připraveného roztoku byly připraveny alikvoty po 5 ml a uchovány při –20 °C.
Před použitím byl alikvot rozpouštěn ve vodní lázni o teplotě 37 °C.

Roztok PMS (phenazine methosulfate)

40 Roztok PMS byl připraven rozpuštěním 0,383 mg PMS (Sigma–Aldrich, kat. č. P9625) v 1 ml
fosfátového pufru (PBS). V 100 ml alikvotech byl skladován při –20 °C.

45 Výsledky stanovení viability nádorových a normálních buněk po působení různých koncentrací
testovaných látek jsou shrnuty v tabulce 9. IC₅₀ udává koncentraci testované látky, která způsobi-
la 50% pokles počtu viabilních buněk (inhibici růstu buněk) po 72 hodinách ovlivnění. Každá
koncentrace helquatu byla testována v triplicátech v rámci jednoho stanovení hodnoty IC₅₀. Kaž-
dý z těchto stanovení hodnoty IC₅₀ bylo opakováno minimálně ve třech nezávislých experimen-
tech. Hodnoty nad 100 μmol.l⁻¹ byly získány extrapolací dat naměřených v rozsahu koncentrací
0–100 μmol.l⁻¹ daného helquatu.

50

Tabulka 9

označení látky	IC ₅₀	
	CCRF CEM	HUVEC
MSC-C13-16	****	≥ 100
MSC-C9-30	****	≥ 100
MJA-C13-22	****	≥ 100
MSC-C9-16	****	≥ 100
MSC-C9-10	****	≥ 100
MSC-C10-10	***	≥ 100
MSB-C11-7	***	≥ 100
MSC-C10-11	***	≥ 100
VDJA-C13-20	***	≥ 100
LSA-C9-32	***	≥ 100
MJA-C13-8	**	≥ 100
MSB-C13-8	**	≥ 100
MSC-C10-36	****	*
MSB-C13-16	***	*
MSC-C10-31	***	*
VDJA-C13-6	***	*
MSC-C15-8	***	*
MSC-C9-18	***	*
HTA-C9-16	***	**
HTA-C9-17	**	*

5

hodnota IC₅₀ leží v rozmezí μmol.l⁻¹

≤ 10 μmol.l⁻¹ ****

11 až 25 μmol.l⁻¹ ***

10 26 až 50 μmol.l⁻¹ **

≥ 51 μmol.l⁻¹ *

≥ 100 μmol.l⁻¹ ≥ 100

Použité buněčné linie, reagensie, programy a přístroje:

15

Buněčné linie:

CCRF–CEM (kat. č. CCL–119, ATCC/LGS Standards–American Type Cell Collection)

HUVEC (kat. č. 354151, BD Biosciences, USA)

20 HGC–27 (kat. č. 94042256, Sigma–Aldrich, USA)

Reagensie:

Kultivace buněk

25

Minimum Essential Medium Eagle (kat.č. M2279, Sigma–Aldrich, USA)

- RPMI-1640 medium (kat. č. R7509, R7638 a R8758, Sigma-Aldrich, USA)
 Dulbecco's Phosphate Buffered Salině (kat.č. D8537, Sigma-AldMCh, USA)
 Penicillin-Streptomycin (kat.č. P0781, Sigma-Aldrich, USA)
 fetální hovězí sérum (kat.č. F9665, Sigma-Aldrich, USA)
 5 L-glutamin, roztok (kat.č. G7513, Sigma-Aldrich, USA)
 MEM Non-essential Amino Acid Solution (kat. č. M7145, Sigma-Aldrich, USA)
 0,25% trypsin-EDTA solution (kat.č. T4049, Sigma-Aldrich, USA)
 kultivační médium pro HUVEC E-STIM™ (kat. č. 355054, BD Biosciences, USA)
 Petriho misky potažené kolagenem I (kat. č. 354450, BD Biosciences, USA)
 10 *Transfekce buněk a Luciferázová reportérová analýza*
- Dual-Luciferase® Reporter Assay Systém (kat.č. E1960, Promega, USA)
 pGL4.10 (*luc2*) Vector (kat.č. E665A, Promega, USA)
 15 pRL-TK Vector (kat.č. E2241, Promega, USA)
 X-tremeGENE HP DNA transfekční činidlo (kat.č. 06366236001, Roche, Švýcarsko)
 Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (kat.č. 31985-062, Life Technologies, USA)
 96-ti jamková destička Nunclon Delta Surface MicroWell Plates (kat.č. 136101, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
 20 Qiagen Plasmid Mini Kit (100) (kat.č. 12125, Qiagen, Německo)
 Qiagen Plasmid Midi Kit (25) (kat.č. 12143, Qiagen, Německo)
- Western Blot*
- 25 Protease Inhibitor Cocktail – PrIC – (kat.č. P8340, Sigma-Aldrich, USA)
 Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail – PhIC (kat.č. 78420, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
 QuantiPro™ BCA Assay Kit (kat.č. QPBCA, Sigma-Aldrich, USA)
 Immobilon-P Membráně (kat.č. IPVH00010, EMD Millipore Corporation, USA)
 Monoklonální myší anti-MYC protilátka (kat.č. 11-433-C100, EXBIO, Praha)
 30 Anti-mouse IgG, HRP-konjugovaná protilátka (kat.č. 7076, Cell Signaling Technology, Inc., USA)
 Monoklonální anti-β-Actin protilátka (kat.č. A5441, Sigma-Aldrich, USA)
 SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substráte (kat.č. 34095, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
 35 Nonfat Dry Milk (kat.č. 9999, Cell Signaling Technology, Inc., USA)
 SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit (kat.č. 407207, EMD Millipore Corporation, USA)
- XTT stanovení*
- PMS (kat. č. P9625, Sigma-Aldrich, USA)
 40 XTT (kat. č. X4626, Sigma-Aldrich, USA)
- Programy:
- Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA)
 45 Quantity One software V.4.6.9 (Bio-Rad, USA).
 GraphPad Prism 5 V.5.04. (GraphPad Software, USA)

Přístroje:

EnSpire Alpha Plate Reader (kat.č. 2300-001 A, Perkin Elmer, USA)

5 ImageQuant LAS 4000 mini (kat.č. 28-9558-13, GE Healthcare Life Sciences, USA)

Fastblot B33 (kat.č. 014-100, Biometra, Německo)

Opticon 2 (kat.č. 200232, MJ Research, USA)

10 Průmyslová využitelnost

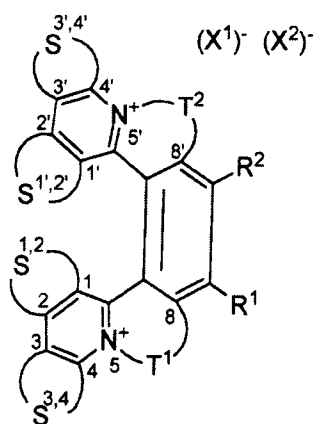
Nové helquaty s heteroaromatickými substituenty mohou být využity k přípravě léčiv pro léčbu onemocnění, souvisejících se zvýšenou proliferací buněk a pro stabilizaci G-kvadruplexů. Další oblast jejich možného využití zahrnuje senzibilizační činidla ve fotografii.

15

20 **PATENTOVÉ NÁROKY**

20

1. Helquaty obecného vzorce I



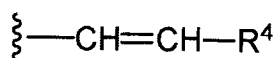
(I),

25

kde

substituenty R^1 a R^2 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny, zahrnující H a C_1 až C_4 alkyl,

30 nejvýše tři páry sousedících atomů v polohách 1 a 2, 3 a 4, 1' a 2', 3' a 4' jsou případně přemostěny spojkou S a zároveň jeden až čtyři atomy se sudým deskriptorem (tj. 2, 4, 2', 4') jsou substituovány substituentem R^3 obecného vzorce II



(II),

35

přičemž R^4 je substituovaný, či nesubstituovaný heteroaryl,

$S^{1,2}$, $S^{1,2r}$, $S^{3,4}$ a $S^{3r,4r}$ je spojka tvořená uhlovodíkovým řetězcem o 3 až 6 atomech uhlíku, s výhodou uhlovodíkovým řetězcem o 4 atomech uhlíku, přičemž struktura jednotlivých spojek S je vzájemně nezávislá, a

5 T^1 a T^2 jsou spojky, které přemostňují atomy N^5 s C^8 a N^{5r} s C^{8r} , kde uvedená spojka je tvořena uhlovodíkovým řetězcem o 2 až 5 atomech uhlíku, s výhodou o 2 nebo 3 atomech uhlíku, přičemž struktura jednotlivých spojek T je vzájemně nezávislá,

kde

10

heteroaryl je aromatická karbocyklická skupina obsahující 4 až 26 uhlíkových atomů a alespoň jeden aromatický kruh, nebo kondenzované aromatické kruhy, v níž je alespoň jeden atom uhlíku aromatického kruhu nahrazen heteroatomem vybraným ze skupiny N, S, O,

15

přičemž heteroaryl může obsahovat 1 až 5 substituentů, vybraných ze skupiny, zahrnující C_6 až C_{16} aryl, C_6 až C_{16} arylalkyl, C_6 až C_{16} arylhalogenalkyl, C_1 až C_6 alkyl, C_1 až C_6 halogenalkyl, C_1 až C_{12} alkoxy, benzyloxy, C_1 až C_6 alkylthio, halogen, $-OH$, $-SH$, $-NH_2$, C_1 až C_6 alkylamino, C_1 až C_6 acylamino, $-CN$, $-SO_3H$, nitro, $-COOR_n$, $-C(=O)N(R_n)_2$, kde R_n je vodík nebo C_1 až C_6 alkyl;

20

anionty $(X^1)^-$ a $(X^2)^-$ jsou na sobě nezávislé anionty solí,

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

25

2. Helquaty obecného vzorce I podle nároku 1, zvolené ze skupiny, zahrnující:

2,4-bis((*E*)-2-(thiofen-3-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

30

(*E*)-2-(2-(dibenzo[b,d]furan-4-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

35

(*E*)-13-(2-(5-(ethoxykarbonyl)-1H-pyrrol-3-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

(*E*)-13-(2-(5-brom-1H-indol-3-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

40

2,13-bis((*E*)-2-(5-bromthiofen-2-yl)vinylo)-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

2,13-bis((*E*)-2-(2,6-dimethoxy-pyridin-3-yl)vinylo)-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

45

19-((*E*)-2-(1-methyl-1H-indol-2-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,

50

19-((*E*)-2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,

19-((*E*)-2-(1H-benzo[g]indol-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,

55

- 19-((*E*)-2-(2-fenyl-1*H*-indol-3-yl)viny)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,
- 5 19-((*E*)-2-(1*H*-indol-5-yl)viny)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,
- 10 19-((*E*)-2-(5-brom-1*H*-indol-3-yl)viny)-6,7,8,11,12,13-hexahydropyrido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3'':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,
- 4,15-bis((*E*)-4-(pyridin-2-yl)styryl)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-a:1',2'-a]benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindiiium trifluormethansulfonát,
- 15 2,4,15,17-tetra((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-indol-2-yl)viny)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-a:1',2'-a]benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindiiium trifluormethansulfonát,
- (*E*)-11-(2-([2,2':5',2''-terthiofen]-5-yl)viny)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,
- 20 (*E*)-11-(2-(dibenzo[b,d]furan-4-yl)viny)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,
- 2,15-bis((*E*)-2-(2,6-dimethoxypyridin-3-yl)viny)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 25 (*E*)-2-(2-(5-brom-1*H*-indol-3-yl)viny)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- (*E*)-13-(2-(dibenzo[b,d]furan-4-yl)viny)-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,
- 30 2,15-bis((*E*)-2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)viny)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 2,15-bis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)viny)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 35 2,15-bis((*E*)-2-(2-fenyl-1*H*-indol-3-yl)viny)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 40 2,15-bis((*E*)-2-(5-brom-1*H*-indol-3-yl)viny)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- (*rac*)-(*E*)-13-(2-(dibenzo[b,d]furan-4-yl)viny)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,
- 45 8,9-dimethyl-2,15-bis((*E*)-2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)viny)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 2,15-bis((*E*)-2-(1*H*-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)viny)-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 50 2,4-bis((*E*)-2-(1*H*-indol-2-yl)viny)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

2,4-bis((*E*)-2-([2,2'-bithiofen]-5-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodiprido[2,1-a:1',2'-k][2,9]-fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

5 2,4-bis((*E*)-2-(benzofuran-2-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodiprido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

(*E*)-2-(2-([2,2'-bithiofen]-5-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodiprido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

10 (*E*)-13-(2-(5-hexylthiofen-2-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

(*E*)-13-(4-(9*H*-karbazol-9-yl)styrylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

15 8,9-dimethyl-2,13-bis((*E*)-2-(4-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodiprido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

20 19-((*E*)-2-(3-methylbenzo[*b*]thiofen-2-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahidropirido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,

25 19-((*E*)-2-([2,2'-bithiofen]-5-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahidropirido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,

19-((*E*)-2-(6-brom-1*H*-indol-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahidropirido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,

30 2,15-bis((*E*)-2-(4-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)vinylo)-6,7,10,11-tetrahydrodiprido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

2,15-bis((*E*)-2-(dibenzo[*b,d*]furan-4-yl)vinylo)-8,9-dimethyl-6,7,10,11-tetrahydrodiprido[2,1-a:1',2'-k][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,

35 (*rac*)-2,4,13,15-tetrakis((*E*)-2-(thiofen-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahidrodiprido[1,2-a:1',2'-a']benzo[2,1-c:3,4-c']bisazepindiium trifluormethansulfonát,

(*E*)-13-(2-(dibenzo[*b,d*]furan-2-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

40 (*E*)-13-(2-(4-fenylthiofen-2-yl)vinylo)-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

45 (*E*)-13-(2-(1*H*-benzo[*g*]indol-3-yl)vinylo)-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

19-((*E*)-2-(7-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinylo)-6,7,8,11,12,13-hexahidropirido[1''',2''':1'',2'']azepino[4'',3''':5',6']benzo[1',2':3,4]azepino[1,2-a]chinolin-5,14-diium trifluormethansulfonát,

50 (*E*)-11-(2-(dibenzo[*b,d*]thiofen-4-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

(*rac*)-(*E*)-13-(2-(9-ethyl-9*H*-karbazol-3-yl)vinylo)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-a]pyrido[1,2-k][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,

55

- (*rac*)-8,9-dimethyl-2,13-bis((*E*)-2-(thiofen-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 5 (*rac*)-2,15-bis((*E*)-2-(1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindiiium trifluormethansulfonát,
- 4,13-bis((*E*)-2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 10 (*E*)-11-(2-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)vinyloxy)-6,7-dimethyl-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-*a*]pyrido[1,2-*k*][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,
- (*E*)-6,7-dimethyl-11-(2-(5-fenylthiofen-2-yl)vinyloxy)-4,5,8,9-tetrahydroisochinolino[1,2-*a*]pyrido[1,2-*k*][2,9]fenantrolin-3,10-diium trifluormethansulfonát,
- 15 (*rac*)-(*E*)-2-(2-(4-nitro-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- (*rac*)-(*E*)-2-(2-(6-isopropyl-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindiiium trifluormethansulfonát,
- 20 (*rac*)-2,17-bis((*E*)-2-(1*H*-indol-5-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindiiium trifluormethansulfonát,
- 25 (*rac*)-4,15-bis((*E*)-2-(2,5-dimethyl-1-(3-(trifluormethyl)fenyl)-1*H*-pyrrol-3-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindiiium trifluormethansulfonát,
- 8,9-dimethyl-2,15-bis((*E*)-2-(2-fenyl-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 30 (*rac*)-2,4,15,17-tetrakis((*E*)-2-(1*H*-indol-2-yl)vinyloxy)-6,7,8,11,12,13-hexahydrodipyrido[1,2-*a*:1',2'-*a'*]benzo[2,1-*c*:3,4-*c'*]bisazepindiiium trifluormethansulfonát,
- (*rac*)-2,4-bis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 35 (*rac*)-2,4-bis((*E*)-2-(4-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát,
- 40 2,4,13,15-tetrakis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyloxy)-6,7,10,11-tetrahydrodipyrido[2,1-*a*:1',2'-*k*][2,9]fenantrolin-5,12-diium trifluormethansulfonát.
- 45 **3.** Helquaty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo helquaty podle nároku 2, či jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro použití jako léčiva.
- 4.** Helquaty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo helquaty podle nároku 2, či jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro použití ke stabilizaci G-kvadruplexů.
- 50 **5.** Helquaty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo helquaty podle nároku 2, či jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro použití k léčbě onkologických onemocnění.
- 6.** Helquaty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo helquaty podle nároku 2, či jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro použití k léčbě onemocnění, souvisejících se zvýšenou proliferací

buněk a k léčbě, vyžadující ovlivnění G–kvadruplexu, s výhodou v telomerách nebo v promotorech genů.

5 7. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň jeden helquat obecného vzorce I podle nároku 1 nebo helquat podle nároku 2, či jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.

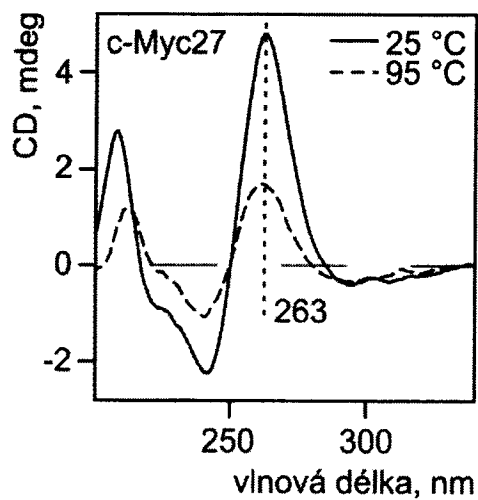
10 8. Farmaceutický prostředek podle nároku 8, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že případně dále obsahuje i další aktivní složku a popřípadě alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič, plnivo nebo ředidlo.

15 9. Farmaceutický prostředek podle nároku 8 nebo 9 pro použití k léčbě onemocnění, souvisejících se zvýšenou proliferací buněk a k léčbě, vyžadující ovlivnění G–kvadruplexu, s výhodou v telomerách, nebo v promotorech genů.

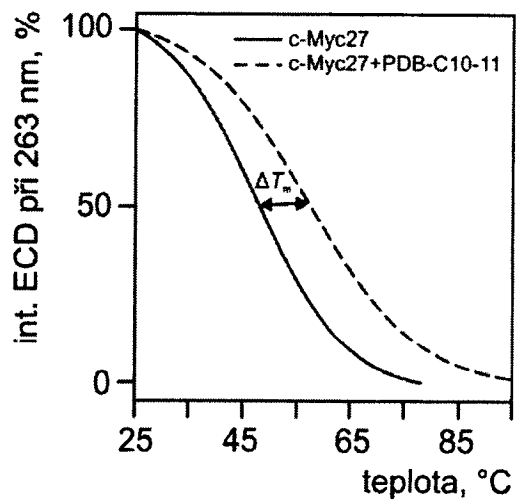
20 10. Použití helquatů obecného vzorce I podle nároku 1 nebo helquatů podle nároku 2, či jejich farmaceuticky přijatelných solí, pro výrobu léčiva k léčení onemocnění, souvisejících se zvýšenou proliferací buněk, onkologických onemocnění a k léčbě, vyžadující ovlivnění G–kvadruplexu, s výhodou v telomerách nebo v promotorech genů.

25 I výkres

Obr. 1:



Obr. 2:



Konec dokumentu